

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ACTIVITY CLIFF COMO FERRAMENTA NA ANÁLISE DA RELAÇÃO ESTRUTURA
ATIVIDADE EM UMA SÉRIE DE INIBIDORES DA ENZIMA FABH BACTERIANA**

AUTOR DISCENTE: Rodolfo André de Araújo Santos

ORIENTADOR: Euzébio Guimarães Barbosa

NATAL-RN

2018

RODOLFO ANDRÉ DE ARAÚJO SANTOS

**ACTIVITY CLIFF COMO FERRAMENTA NA ANÁLISE DA RELAÇÃO ESTRUTURA
ATIVIDADE EM UMA SÉRIE DE INIBIDORES DA ENZIMA FABH BACTERIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Desenvolvimento e avaliação de Medicamentos

Orientador: Prof. Dr. Euzébio Guimarães Barbosa

NATAL – RN

2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Santos, Rodolfo Andre de Araujo.

Activity Cliff como ferramenta na análise da relação estrutura atividade em uma série de inibidores da enzima FabH bacteriana / Rodolfo Andre de Araujo Santos. - 2018.

91f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Natal, RN, 2018.

Orientador: Euzébio Guimarães Barbosa.

1. Resistência microbiana a medicamentos - Dissertação. 2. Activity Cliff - Dissertação. 3. FabH - Dissertação. 4. Relação estrutura atividade - Dissertação. I. Barbosa, Euzébio Guimarães. II. Título.

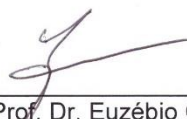
RN/UF/BS-CCS

CDU 615.33

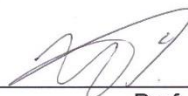
Rodolfo André de Araújo Santos

**ACTIVITY CLIFF COMO FERRAMENTA NA ANÁLISE DA
RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE EM UMA SÉRIE DE
INIBIDORES DA ENZIMA FABH BACTERIANA**

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Euzébio Guimarães Barbosa
Presidente – UFRN



Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti
Examinador Externo – UFPB



Profa. Dra. Vanessa Almeida Otelo
Examinador Interno – UFRN

Natal, 30 de maio de 2018

NATAL / RN
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por me capacitar para esta trajetória, me protegendo e me abençoando com saúde e com a presença de pessoas queridas, que me ajudaram, cada uma a sua maneira, a chegar até aqui. Reconheço a presença e o cuidado Dele em cada parte de minha vida, e peço desculpas pelos sucessivos pedidos de intercessão por mim em forma de oração, feitos por minha esposa e minha família.

A meus pais, que reconheceram em mim desde cedo o interesse e curiosidade pela ciência (lembram-se do colchão incendiado com permanganato?), e investiram em minha educação. Hoje, imagino que não deve ser fácil deixar seu filho ainda criança sair do interior e do seio familiar buscar uma educação melhor na capital, a quilômetros de distância. Espero que as renúncias e as inúmeras viagens até a mudança definitiva tenham valido a pena, e que tenham orgulho de mim. É por vocês e por Rafael e Jéssica que sempre busco dar meu melhor, para que sejamos uma família cada vez mais unida. Ainda que eu escrevesse mais páginas que esta dissertação para enumerar tudo o que fizeram por mim e para agradecer os sacrifícios e dedicação de vocês por nós, não seria suficiente.

Rafael e Jéssica, vocês são meus irmãos mais novos, mas aprendi tanto com vocês. Apendi o valor da resiliência, a não desistir diante dos obstáculos e de como ter laços com nossos irmãos transmite sinceridade. Em vocês, enxergo o amor e a felicidade genuínos com cada conquista minha, percebo a união para fazer dar certo nos momentos difíceis. No que depender de mim, sempre seremos assim. Muito obrigado.

Agradeço a Euzébio, meu orientador, por ter acreditado em mim. Por não desistir de mim, mesmo sabendo de minhas limitações e por me ajudar na árdua tarefa de conciliar o mestrado, o trabalho, a reforma de minha casa e meu casamento. Obrigado por sempre compreender a dinâmica maluca da minha rotina, e por me motivar a ser sempre um orientando inquieto, buscando ser melhor naquilo que me propuser a fazer. Agradeço também a Amanda, que partilha do mesmo interesse pela área, e muito me auxiliou neste trabalho.

Aos meus colegas e amigos da Escola Agrícola de Jundiáí, por me darem suporte nessa fase, sempre à disposição a me ajudar no que fosse preciso. Dona Val, Isaque, Gean e Amanda, muito obrigado pelos momentos de descontração na correria nossa de cada dia. A professor Júlio,

a quem sou grato pela compreensão e flexibilidade a mim concedidas para que conseguisse lograr êxito em mais esse degrau de minha vida acadêmica.

Sou grato também aos amigos Artur, Denis, Kamilo, Leandro, Pedro e Otto, pela amizade desde a época do antigo CEFET, e por compreender a ausência nos últimos tempos. Sou feliz em saber que crescemos e amadurecemos juntos, e que estaremos sempre aqui, uns pelos outros.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a minha esposa, Bruna. Construir um lar como você sempre diz, não é fácil. Sou grato por me dar todo o suporte necessário para que eu conseguisse dar continuidade a tantos projetos importantes ao mesmo tempo, pela empatia por minha situação e por ser a calma que me acalentava nos momentos de angústia.

A todos os citados e muitos outros, que de maneira mais ou menos intensa contribuíram para que este trabalho fosse possível agradeço imensamente. Fazer ciência de qualidade em nosso país infelizmente mostra-se tarefa a cada dia mais árdua, e demanda cada vez mais um trabalho conjunto maior. Cada letra que aqui se encontra envolveu esforço e dedicação em grupo, e eu não seria capaz de nada disso sem vocês. Muito, muito obrigado.

RESUMO

A síntese de ácidos graxos, principalmente pela enzima β -cetoacil-ACP sintase III (FabH), vem despontando como um excelente alvo para novas moléculas com ação antimicrobiana. Apesar da urgência gerada pela crescente resistência bacteriana, a síntese de novas moléculas se mostra uma tarefa bastante dispendiosa tanto em tempo como em recursos financeiros. Neste sentido, utilizar-se das informações contidas nos ligantes, já sintetizados, para extrair o máximo de informação da afinidade pelos alvos, configura-se como uma alternativa de baixo custo operacional para o desenvolvimento direcionado de novos compostos ativos. Uma maneira eficaz de extrair estas informações dos ligantes é perceber que partes destas moléculas melhor contribuem com a atividade biológica. Porém, quando diante de esqueletos moleculares tão distintos, torna-se difícil a percepção de tais fatores. Desta forma, são as pequenas diferenças em moléculas bastante similares que melhor definem as regiões da molécula, e do inibidor, que contribuem para uma maior potência. A relação entre este grupo de moléculas é conhecido como Activity Cliff. Diante de todas as vantagens expostas escolheu-se esta metodologia para guiar a síntese de novos inibidores da enzima FabH. A partir deste estudo, foi possível determinar componentes farmacofóricos que podem guiar o desenho de novos inibidores da enzima FabH. Grupos doadores de hidrogênio na região catalítica do sítio ativo, juntamente com grupos volumosos que aumentem a superfície de contato com a tríade catalítica aliados a grupos aceptores de ligação de hidrogênio próximo aos aminoácidos arginina 249, arginina 36 e asparagina 210 foram os fatores percebidos para o aumento da atividade. Por fim, grupos similares a quinolina que possam interagir com os aminoácidos arginina 151, triptofano 32 em um bolso lateral adicional e realizar ligações de hidrogênio com o aminoácido treonina 28.

ABSTRACT

The synthesis of fatty acids, mainly by the enzyme β -ketoacyl-ACP synthase III (FabH), has been emerging as an excellent target for new molecules with antimicrobial action. Despite the urgency generated by increasing bacterial resistance, the synthesis of new molecules is a very expensive task in time and in financial resources. In this sense, to use the information contained in the binders, already synthesized, to extract the maximum information of the affinity for the targets, is configured as an alternative of low operational cost for the directed development of new active compounds. An effective way of extracting this information from ligands is to realize that parts of these molecules best contribute to biological activity. However, when faced with such different molecular skeletons, it becomes difficult to perceive such factors. Thus, it is the small differences in fairly similar molecules that best define the regions of the molecule, and the inhibitor, which contribute to increased potency. The relationship between this group of molecules is known as Activity Cliff. In view of all the advantages exposed, this methodology was chosen to guide the synthesis of new inhibitors of the FabH enzyme. From this study, it was possible to determine pharmacophore components that can guide the design of new inhibitors of the FabH enzyme. Hydrogen donor groups in the catalytic region of the active site, together with bulky groups that increase the contact surface with the catalytic triad allied to electron acceptor groups close to the amino acids arginine 249, arginine 36 and asparagine 210 were the perceived factors for the increase of the activity. Finally, quinoline-like groups that can interact with the amino acids arginine 151, tryptophan 32 in an additional side pocket and make hydrogen bonds with the amino acid threonine 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 01– Banco de Moléculas FabH.....	40
Tabela 02 – Valores de Energia x Posição.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Conversão do Acetil-CoA em Malonil-ACP.....	17
Figura 2 - Síntese do B-cetoacil-ACP.....	18
Figura 3 - Síntese do B-cetoacil-ACP.....	18
Figura 4- Ciclo de alongamento dos ácidos graxos.....	19
Figura 5 - Sítio Ativo FabH e FabB	20
Figura 6 - Interações do Ligante Cristalografado em Código PDB ID: 1HNJ	22
Figura 7- Interações do Ligante Cristalografado em Código PDB ID: 1MZS	22
Figura 8 – Principais Regiões de interação.	23
Figura 9 – Regiões do Sítio Ativo	24
Figura 10- Relação entre a Diferença de Atividade e a Similaridade Molecular	25
Figura 11– Fluxograma de Atividades.	31
Figura 12 – Planilha de Atividades.	34
Figura 13 – Planilha resultados SALI E FILTRO	35
Figura 14– Planilha resultados <i>ShaEP</i>	36
Figura 15 – Activity Cliff a partir da similaridade 2D.....	55
Figura 16 – Activity Cliff em Linha	56
Figura 17 - Interações de moléculas para grupo I – parte1.....	57
Figura 18- Interações Grupo I - Parte II.....	58
Figura 19- Grupo II - Grupo misto entre linha e em estrela	58
Figura 20 - Grupo II cluster I.....	59
Figura 21 – Grupo II Cluster I tamanho da cadeia x substituínte.....	60
Figura 22 - Grupo 02 moléculas	61
Figura 23 - Grupo 02 moléculas bmc182010.....	62
Figura 24 – Activity Cliff Similaridade 3D	63

Figura 25 – Fluxograma AC	64
Figura 26 – Subestruturas comuns entre Moléculas de um par AC	66
Figura 27 – Posição de Ancoragem moléculas 55, 80 e 41	67
Figura 28 – Posição de Ancoragem molécula 60.....	68
Figura 29 - Posição de Ancoragem moléculas 145, 152, 200 e 232	68
Figura 30 – Semelhanças estruturais Grupo I	69
Figura 31 – Posição de Ancoragem Grupo I	70
Figura 32– Região SI grupos volumosos	71
Figura 33 – Grupo I Posição de ancoragem	71
Figura 34 – Grupo II Posição de Ancoragem.....	72
Figura 35 – Grupo II posição de ancoragem moléculas 80, 232 e 41	73
Figura 36 – Grupo III – Posição de ancoragem	74
Figura 37 - Grupo IV – Posição de Ancoragem.....	75
Figura 38- Estrutura da molécula Ideal	76

LISTA DE ABREVIACÕES

50% da concentração inibitória máxima (IC50),

Ácido Graxo Sintase - (FAS)

Arginina 151 (Arg 151)

Arginina 249 (Arg 249)

Arginina 36 (Arg 36)

Asparagina 247 (Asn 247)

Fenilalanina (Phe 304).

Glicina 209 (Gly 209),

Índice Panorama Estrutura Atividade (SALI)

Índice Relação Estrutura Atividade (tradução livre) (SARI)

Isoleucina 156 (Ile 156),

Malonil-CoA-ACP transacilase (FabD)

Activity Cliff (AC)

Protein Data Bank (PDB)

Proteína acil-carreadora (ACP)

Similaridade de Atividade (SAS)

Síntese de ácidos graxos tipo II (FAS II)

Tanimoto (SIM)

Treonina 28 (Thr 28)

Treonina 37 (Thr 37)

Triptofano 32 (Trp 32)

Valina 212 (Val 212),

β -cetoacil-ACP sintase III - (FabH)

Sumário

1.0 – INTRODUÇÃO	14
2.0 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
2.1 – Resistência Bacteriana	16
2.2 – Síntese de Ácidos Graxos em bactérias	17
2.3 – O potencial do FabH como possível alvo para o desenvolvimento de fármacos	19
2.5 – <i>Activity Cliff</i>	25
2.6 – Structure–Activity Landscape Index (SALI)	27
3.0 – OBJETIVOS	29
3.1 – Objetivo Geral	29
3.2 – Objetivos Específico	29
4.0 – MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Material	30
4.1.1– Metodologia	30
4.2 Etapa Preparação.	32
4.2.1 – Definição das moléculas	32
4.2.2 – Atividade Biológica	32
4.2.3 –Desenho e conferência da conformação das moléculas	32
4.3 Etapa de Ensaios.	33
4.3.1 Similaridade de 2D	33
4.3.1.1 Planilha de Resultados Tanimoto	33
4.3.1.3 – Coluna Filtro	35
4.3.2 – Similaridade 3D	35
4.3.2.1 – Planilha de resultados <i>ShaEP</i>	36
4.3.2.2 – SALI _{ShaEP} e Filtro.	37
4.4 Etapa de Avaliação dos Resultados	37
4.4.2 Dinâmica Molecular	38
4.4.2.1 Etapa Inicial	38
4.4.2.2 Etapa de Simulação	38
4.4.3 – Visualização dos resultados	39
5.1 – Banco de Moléculas FabH	40
5.2 – Activity Cliff – Similaridade 2D	55
5.3 – <i>Activity Cliff</i> 2D entre moléculas com estrutura cristalográfica	55
5.4 – Activity Cliff similaridade 2D grupo II	58
5.5 Activity Cliff – Similaridade 3D	62
5.5.1 Determinação da posição espacial das moléculas.	63
5.5.2 Discussão dos Pares AC.	69
REFERÊNCIAS	78

1.0 – INTRODUÇÃO

A terapêutica com antibióticos trouxe a diminuição das mortes causadas por doenças infecciosas, elevando-se, com isto, a síntese de novos antimicrobianos, especialmente, entre décadas de 40, 50 e 60 (ROCHA et al., 2011). No entanto, a alta performance desta classe de medicamentos, acarretou no uso indiscriminado dos mesmos, enquanto, em contrapartida, ocorria a diminuição de seu uso clínico dado o aumento da resistência destes microrganismos (ROCHA et al., 2011). Com o surgimento do vírus HIV, somada ao panorama de resistência bacteriana estabelecida, houve então o aumento desenfreado de mortalidade, culminando em, aproximadamente, 25% das 58,8 milhões de mortes no ano de 2010 (KHABBAZ et al., 2014).

Atualmente, estima-se que cerca de 700 mil óbitos por ano tenham sido causados por superbactérias, e se não houver mudanças relevantes no panorama atual, como por exemplo, o desenvolvimento de novos fármacos, a previsão é de que a partir de 2050, 10 milhões de pessoas morram por infecções de origem bacteriana. O ônus financeiro projetado neste cenário futuro figuraria em algo por volta de 100 trilhões de dólares/ano relacionados aos gastos com tentativas de combate de infecções bacterianas (O'NEILL, 2014).

Este cenário de resistência microbiana, fruto do processo de pressão seletiva que o uso indiscriminado de antibióticos causou, resultou em uma queda no espectro de ação, tendo como consequência baixa na eficácia ou inutilidade de alguns antimicrobianos contra determinados patógenos. Assim multirresistência bacteriana aos antibióticos constitui, hoje, um dos maiores problemas de saúde pública mundial (DEL FIOLE et al., 2010).

Apesar do surgimento de políticas que impõem o uso racional de antibióticos, reverter o panorama de resistência microbiana, já estabelecido, implica em maiores estudos sobre a dinâmica bacteriana, seus mecanismos de sobrevivência e o desenvolvimento de fármacos mais avançados, de ação mais específica (ROCA et al., 2015).

Biologicamente, sabe-se que os lipídeos constituem a maior parte da membrana plasmática das bactérias, auxiliando na composição de estruturas essenciais de sua formação, como fosfolipídios e lipopolissacarídeos. Tais elementos integram o arcabouço fundamental à biofísica da membrana bacteriana. Neste microambiente, a síntese de ácidos graxos é realizada através do sistema Ácido Graxo Sintetase II - FAS II, que é similar em bactérias, parasitas e plantas (LU; ZHANG; ROCK, 2004).

Ao contrário do mecanismo de síntese encontrado em mamíferos (que possuem o sistema FAS I), o sistema FAS II é capaz de sintetizar não apenas um, mas vários ácidos graxos. Tal diferença evidencia uma grande oportunidade no desenvolvimento de novos antimicrobianos. Portanto, com base nessas informações, novos esforços vêm sendo realizados na busca por novos antibióticos capazes de romper com a resistência bacteriana (WHITE et al., 2005a).

No tocante ao estudo de novas estratégias antimicrobianas, a metodologia *activity cliff* vem se destacando, por conseguir interpretar relações entre moléculas muitas vezes desconsideradas no espaço amostral. Este grupo peculiar de moléculas, que têm por características grande similaridade estrutural, mas com grande disparidade no que concerne à potência. Tais moléculas são, muitas vezes, vistas como *outliers*, e especialmente durante os primeiros estágios do planejamento racional, este grupo pode contribuir para o surgimento de novos fármacos (PÉREZ-VILLANUEVA et al., 2015).

Por fim, ao estudar um vasto grupo de inibidores para a enzima FabH é possível que entre estes existam moléculas que se enquadrem como *activity cliff*. Desta forma, ao entender-se como estas moléculas ancoram-se ao sítio ativo é admissível que se consiga identificar padrões estruturais críticos na determinação da atividade biológica.

2.0 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 – Resistência Bacteriana

Desde a descoberta da penicilina, vem recaindo sobre os antimicrobianos a responsabilidade de combater todos os tipos de infecções (WHO, 2014). Entre os anos 1900 e 1980, a inclusão destes fármacos promoveu a diminuição das mortes causadas por doenças infecciosas. Este número passou de 797 para 36 mortes a cada 100.000 mil pessoas, um quantitativo vinte vezes inferior. Principalmente durante as décadas de 70 e 80, a maioria dos fármacos respondia de forma eficaz aos mais diversos patógenos. Somando-se a erradicação de doenças importantes, como a varíola, creditou-se aos antibióticos uma ideia geral de resolutividade contra estas doenças (POWER,2006)

Influenciados por este cenário, disseminou-se o uso indiscriminado das opções terapêuticas disponíveis, ao passo que ocorreu uma diminuição no desenvolvimento e distribuição de novos fármacos no mercado (POWER,2006). Porém, a disseminação do vírus HIV e a propagação da resistência aos antimicrobianos resultaram na retomada da pujança de letalidade dos microrganismos (POWER,2006), culminando em, aproximadamente, 25% das 58,8 milhões de mortes no ano de 2010 (KHABBAZ et al.,2014).

A resistência bacteriana caracteriza-se como um processo natural dos microrganismos, porém se torna mais rápida e eficiente na presença de pressão seletiva sobre estas populações, acelerando as mutações e recombinações destes organismos (MOTA et al., 2005). Esta realidade provocou um processo de resistência bacteriana (WHO, 2014).

A consequência desta resistência microbiana reflete-se em antimicrobianos com o espectro de ação cada vez menor, diminuindo sua eficácia ou os tornando inúteis contra determinados tipos de patógenos, (WHO,2014b). Isto impulsiona um aumento relevante de patógenos que apresentam multirresistência aos agentes antibacterianos (GOULD; BAL, 2013), tornando estes microrganismos um problema de saúde pública global (ROCA et al., 2015).

Diante do exposto, é urgente o uso adequado das reservas terapêuticas, bem como é de suma importância incentivar a produção de novos fármacos com ação antimicrobiana, aumentando assim, as opções terapêuticas disponíveis no combate as doenças infecciosas. Uma das formas de sobrepor a resistência bacteriana e a toxicidade é investir na inibição de novas rotas metabólicas microbianas, que sejam mais seguras e afastem-se dos mecanismos de resistência já conhecidos (RICHARDSON, 2017; WRIGHT, 2017).

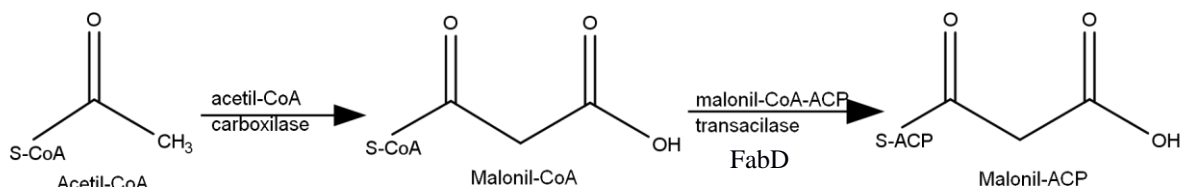
2.2 – Síntese de Ácidos Graxos em bactérias

Os lipídeos são o maior grupo de componentes da membrana plasmática bacteriana, compondo estruturas fundamentais a sua formação, como fosfolipídios e lipopolissacarídeos. Estes constituintes, além de um papel estrutural, formam um arcabouço para as propriedades biofísicas da membrana (LU;ZHANG;ROCK, 2004).

A síntese de ácidos graxos em mamíferos acontece através de uma única enzima multifuncional, a Ácido Graxo Sintase (FAS). Esta enzima possui como substratos naturais: o acetil-CoA e o malonil-CoA, que realizam toda a via metabólica para a síntese, apenas do ácido graxo palmítico (WHITE et al., 2005a). O mecanismo alternativo a esta síntese é dado pelo sistema FAS II, sendo encontrado em bactérias, parasitas e plantas. Diferentemente do mecanismo encontrado em mamíferos, o FAS II utiliza-se da combinação de diversas enzimas com atividades distintas, e seu produto final não se restringe apenas ao palmitato, podendo sintetizar uma diversidade de ácidos graxos (WHITE et al., 2005a).

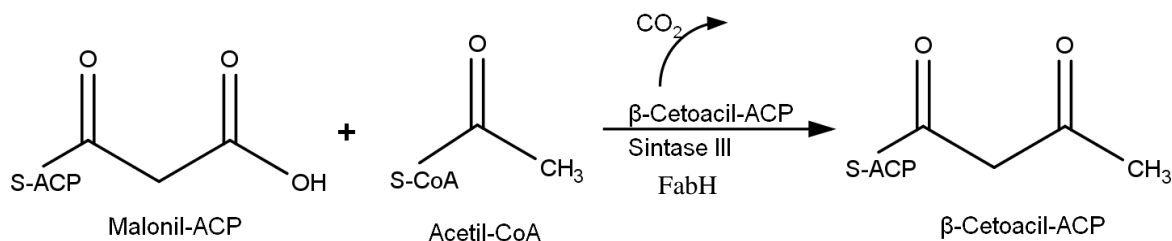
A síntese de ácidos graxos, no sistema FAS II, inicia-se com a formação do malonil-CoA, catalisada pela enzima acetil-CoA carboxilase, que acetila o substrato desta reação, o Acetil-CoA. Em seguida, ocorre a transferência do grupo malonato do composto malonil-CoA para a proteína acil-carreadora (ACP). Esta transferência é mediada pela enzima malonil-CoA-ACP transacilase (FabD) (Figura 01) (ZHANG;WHITE; ROCK, 2006).

Figura 1 - Conversão do Acetil-CoA em Malonil-ACP



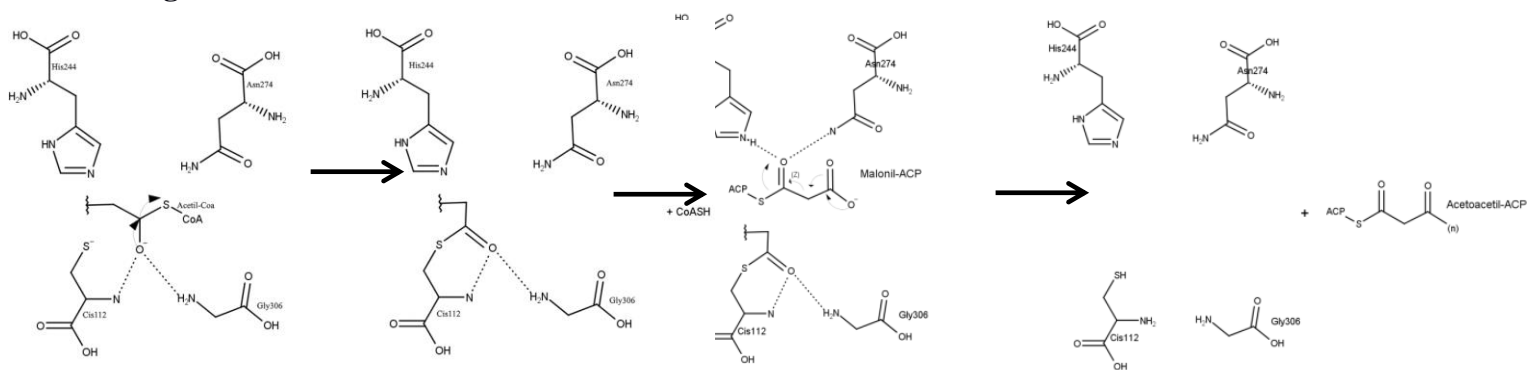
Fonte: Elaborada pelo autor

A próxima etapa da biossíntese de ácidos graxos ocorre uma condensação do tipo Claisen, no qual dois ésteres, ou tio ésteres são condensados a um β-ceto-éster. A condensação do malonil-ACP e do acetil-CoA é catalisada pela enzima β-cetoacil-ACP sintase III (FabH), gerando o β-cetoacil-ACP e CO₂ (Figura 2) (WHITE et al., 2005a).

Figura 2 - Síntese do β -cetoacil-ACP

FONTE: Elaborada pelo autor

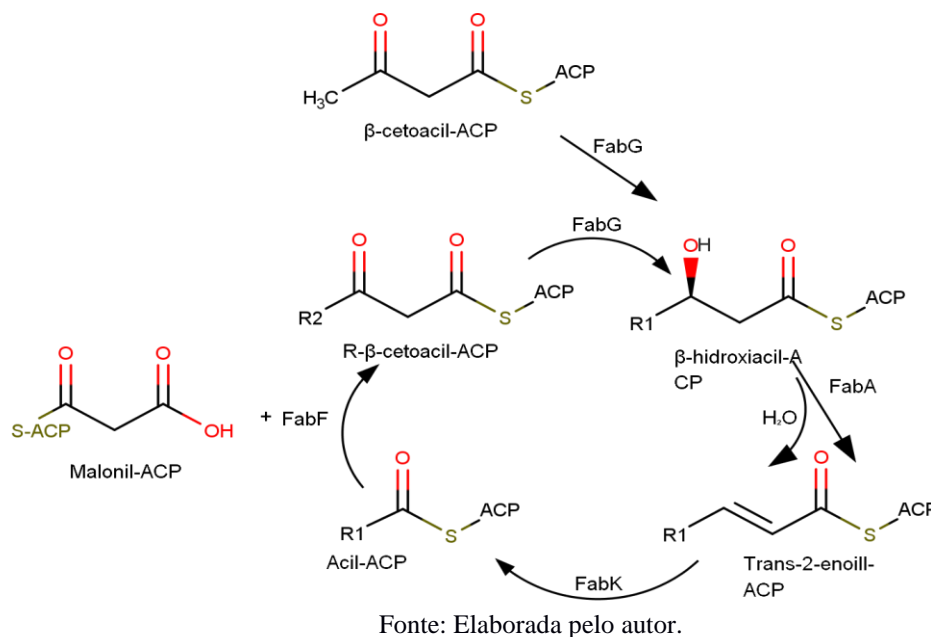
A reação tipo Claisen ocorre entre tioéster através de um mecanismo ping pong, com a formação de um intermediário entre o grupo acetil do acetil-CoA com o grupo sulfidril da cisteína, através de um ataque nucleofílico no grupo sulfidril da cisteína 112, liberando a Coenzima A (figura 3). O malonato-ACP no interior do sítio ativo forma ligações de hidrogênio com a histidina na posição 244 e a asparagina na posição 274, através do tioéster presente em sua composição. A interação entre estes grupos favorece a formação de um estado de transição com o ânion resultante, sendo este estabilizado pelos resíduos supracitados. Por fim, o malonato-ACP através do carbono, ligado ao enxofre e ao oxianion, ataca o acetil que estava ligado a cisteína com a liberação de CO_2 e do Acetoacetyl-ACP (CASTILLO; PÉREZ, 2008; WHITE et al., 2005)

Figura 3 - Síntese do β -cetoacil-ACP

Fonte: Adaptado de(CASTILLO; PÉREZ, 2008)

O β -cetoacil-ACP encabeça uma nova etapa do sistema FAS II, o ciclo de alongamento. O ciclo de alongamento é composto pelas enzimas FabG, FabA, FabK e FabF, ou suas respectivas isoformas. Estas enzimas trabalham sequencialmente e têm o papel de alongar a cadeia de ácidos graxos, promovendo a adição de dois átomos de carbono a cada volta do ciclo, até a formação do ácido graxo pretendido (Figura 4) (ANDRADE et al., 2008).

Figura 4- Ciclo de alongamento dos ácidos graxos.



Caso ocorra a inibição da enzima FabH, na etapa inicial do processo de síntese de ácido graxo, esta mudança é incompatível com a viabilidade do microrganismo. Neste sentido, a inibição da síntese de ácidos graxos tipo II (FAS II) alia características importantes, como um mecanismo de ação inovador e a utilização de uma rota metabólica exclusiva do patógeno (ZHANG; LI; ZHU, 2012).

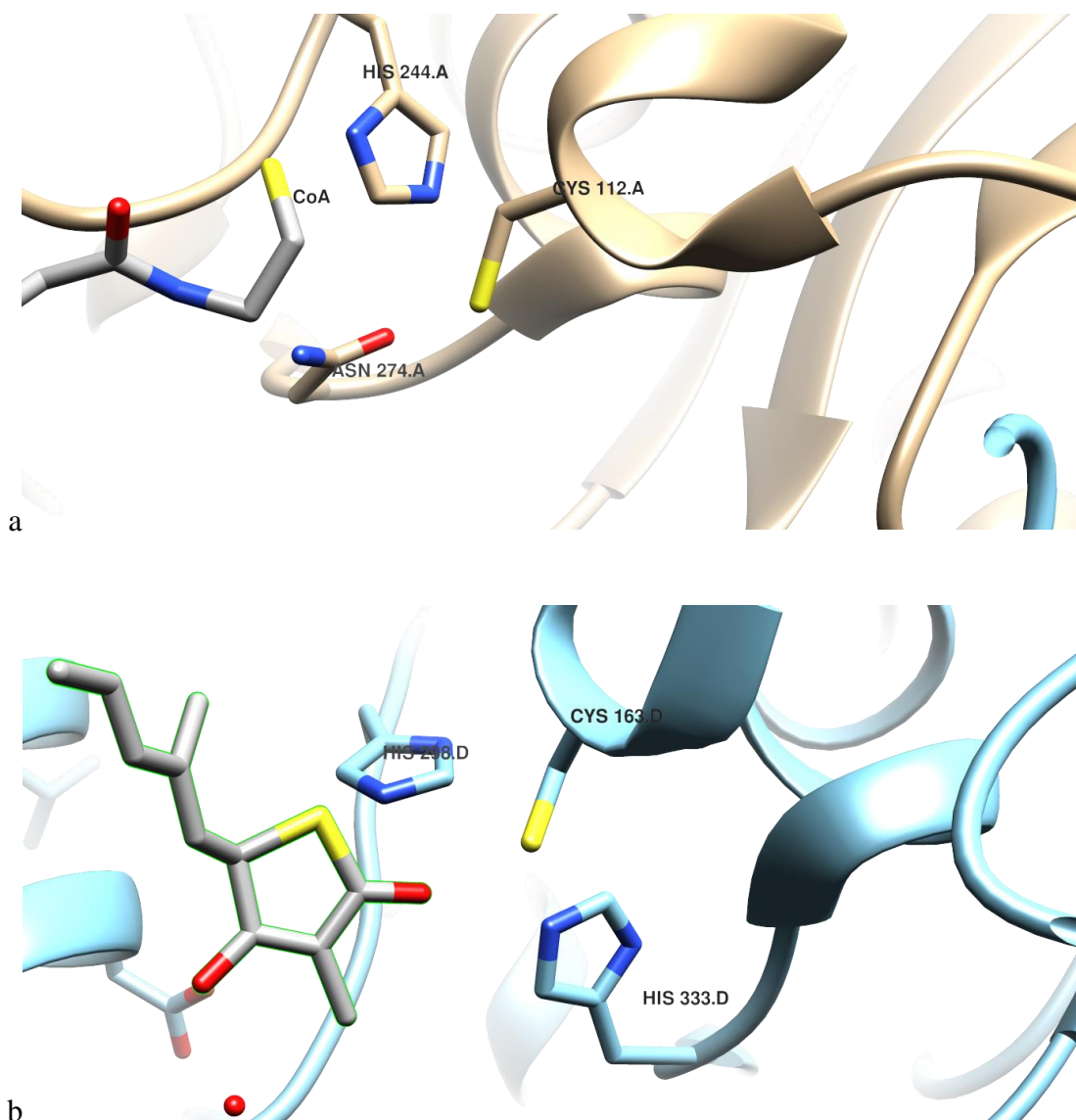
2.3 – O potencial do FabH como possível alvo para o desenvolvimento de fármacos

Na literatura, encontram-se diversas estruturas para a enzima FabH referentes a diferentes microrganismos. Apesar das diferenças intrínsecas, as mesmas guardam entre si uma estrutura geral bastante similar. Todas as enzimas são dímeros cada um com um sítio ativo idêntico, os monômeros que compõem esse dímero possuem uma parte *N*-terminal e uma *C*-terminal, e este sítio ativo apresenta os aminoácidos cisteína, asparagina e histidina, nas posições 112, 274 e 244 respectivamente (figura 5a) (PARSONS; ROCK, 2013).

A enzima FabH é uma das três enzimas de condensação que compõem a síntese de ácidos graxos do tipo FAS II, além desta, existem as enzimas FabB e FabF cada uma atuando em diferentes etapas do ciclo. O sítio ativo da enzima FabH, e das demais enzimas de condensação, assemelha-se a um túnel com aproximadamente 20 angströms de profundidade e 5 angströms de largura. No

fundo deste túnel a enzima FabH apresenta uma tríade catalítica formada pelos resíduos de histidina, cisteína e asparagina (figura 5a) o que a difere das enzimas FabB e FabF as quais tem sua tríade formada por dois resíduos de Histidina e um de cisteína (figura 5b) (WHITE et al., 2005)□.

Figura 5- Sítio Ativo FabH e FabB / FabF



Fonte: 5a adaptado de código PDB ID:1HNJ (QIU et al., 2000); 5b adaptado código PDB ID:2AQB (KIM et al., 2006)

Os três aminoácidos principais, já citados, são fundamentais para a reação de condensação, porém a cisteína da posição 112 tem papel fundamental na fase de ligação do

substrato natural. Isto deve-se a dois fatores: o primeiro é seu posicionamento, na parte mais profunda do sítio ativo, mantendo-o distante o suficiente dos resíduos de histidina e asparagina, entre outros resíduos, que poderiam ativar o enxofre da cisteína (CASTILLO; PÉREZ, 2008)□. Outro fator é o estado de protonação do enxofre da cisteína, proporcionado através do efeito dipolo da alfa-hélice a qual a cisteína se encontra. Esta configuração favorece a reação de transacilação, por proporcionar o ataque deste enxofre ao oxigênio do substrato natural (WHITE et al., 2005)□.

A enzima FabH atua no sistema FAS II de duas maneiras. Iniciando a primeira reação de condensação, etapa crucial à via metabólica, determinará o quantitativo de lipídios sintetizados, a partir desta via. Ademais, também apresenta um papel qualitativo na escolha de novas cadeias de ácidos graxos. Este mecanismo ocorre devido à razão dos ácidos graxos de cadeia longa ligados ao ACP, e os pertencentes a membrana plasmática, à razão entre estes ácidos graxos, define o tipo de ácido graxo a ser sintetizado (WHITE et al., 2005).

A enzima FabH está presente em diversos microrganismos, muitos destes patógenos ao ser humano, além disto, por tratarem-se de vias biossintéticas distintas não existem enzimas similares no genoma humano (CASTILLO; PÉREZ, 2008)□. A ausência ou inibição da ação da enzima FabH, é incompatível com a continuidade do sistema FAS II, desta forma, inibindo a formação de membranas celulares e culminando com a morte do microrganismo. (LAI; CRONAN, 2003). Neste sentido, a inibição da síntese de ácidos graxos tipo II (FAS II) alia características importantes, como, um mecanismo de ação inovador e a utilização de uma rota metabólica exclusiva do patógeno (ZHANG; LI; ZHU, 2012).

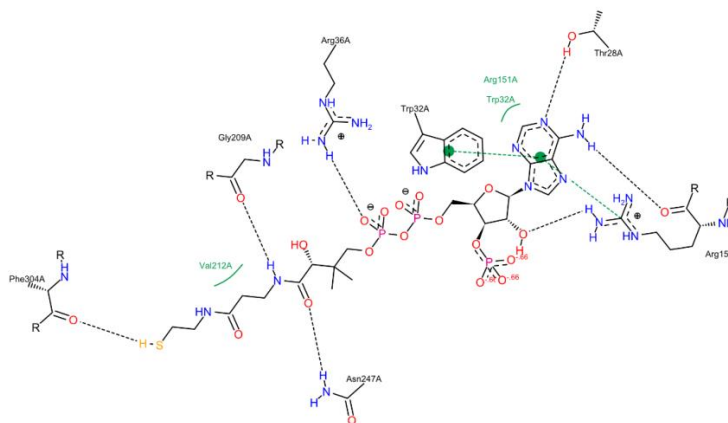
A sugestão de inibidores competitivos para enzima FabH mostra-se um caminho bastante promissor, tendo em vista as vantagens inerentes a esta via, como: utilização de nova via metabólica, amplo espectro de ação, moléculas com baixa resistência bacteriana e toxicidade. Por fim, a proposição e avaliação de moléculas em ambiente virtual aumentam a contribuição científica neste campo de estudo. Além disto, entender o funcionamento das moléculas já sintetizadas para esta via pode funcionar como guia na racionalização do desenho de novos inibidores.

2.4– Dados estruturais de FabH - ligantes

Apesar da dinamicidade das interações entre inibidor-receptor, e das diferentes maneiras que uma molécula possa ligar-se ao receptor, certas regiões do sítio ativo costumam ser prevalentes na determinação da afinidade. A partir de comparações entre diversos inibidores e estruturas cristalográficas da enzima FabH, procura-se antecipar algumas características em comum na interação destas moléculas com a enzima FabH da *E.coli*.

O substrato natural malonil-CoA está cristalografado com a enzima FabH segundo código PDB 1HNJ (QIU et al., 2001), e suas interações estão descritas conforme figura 6. Percebe-se que o substrato interage através de forças polares e apolares e que estas interações estão dispostas através de toda a extensão do malonil-CoA. Considerando a natureza das interações têm-se interações hidrofóbicas tipo Van der Waals, com os aminoácidos Valina 212 (Val 212), Arginina 151 (Arg 151) e Triptofano 32 (Trp 32). Este último, através de interações do tipo empilhamento- π . No conjunto de ligações polares, existem ligações de hidrogênio com os aminoácidos Arg 151, Treonina 28 (Thr 28), Glicina 209 (Gly 209), Asparagina 247 (Asn 247) a Fenilalanina (Phe 304), além de pontes salinas com o aminoácido Arginina 36 (Arg 36). Por fim, a Arg 151 ainda possibilita ligações do tipo cátion- π com o grupo purina do malonil-CoA (QIU et al., 2001).

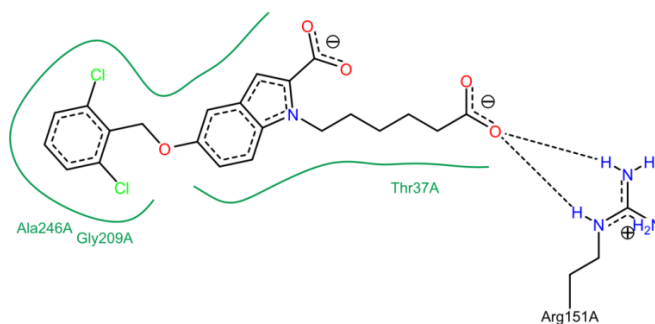
Figura 6 - Interações do Ligante Cristalografado em Código PDB ID: 1HNJ



Fonte: (QIU et al., 2000)

Um estudo posterior ainda em cepas de *E.coli* propôs o reconhecimento não mais do ligante natural, mas de um inibidor co-cristalografado com enzima FabH de código PDB 1MZS (DAINES et al., 2003). As interações desta molécula no sítio ativo do ligante natural estão descritas na figura 7. Ela realiza interações hidrofóbicas com Alanina 246 (Ala 246) Gly 209 e Treonina 37 (Thr 37) e ligação direcionais do tipo ponte salina com a Arg 151 (DAINES et al., 2003).

Figura 7- Interações do Ligante Cristalografado em Código PDB ID: 1MZS

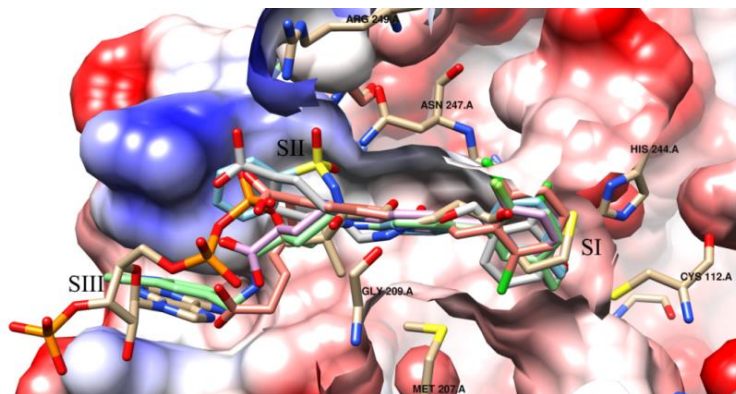


Fonte: (DAINES et al., 2002)

A partir dos esforços de David C. McKinney e colaboradores novos depósitos para esta enzima, com inibidores inéditos, foram disponibilizados no *Protein Data Bank* (PDB) aumentando a gama de informações, sobre interação, para a *E.coli*. As estruturas de códigos PDB 4Z8D 5BNM, 5BNR e 5BNS (MCKINNEY et al., 2016) foram um dos resultados deste projeto e as respectivas moléculas e suas interações estão descritas na figura 08.

Ao alinharem-se todas estas moléculas no sítio ativo percebem-se três regiões de interação que de forma simplificada pode-se classificar como SI, SII e SIII. Estas regiões levaram em conta a distribuição espacial destes aminoácidos no interior do sítio ativo e estão descritas na figura 08

Figura 8– Principais Regiões de interação.



Legenda: A superfície da enzima está colorida segundo o potencial de Coulomb dos aminoácidos que compõem cada região. A cor azul representa um potencial de Coulomb positivo, as regiões em branco potencial neutro e as regiões em vermelho potencial de Coulomb negativo.

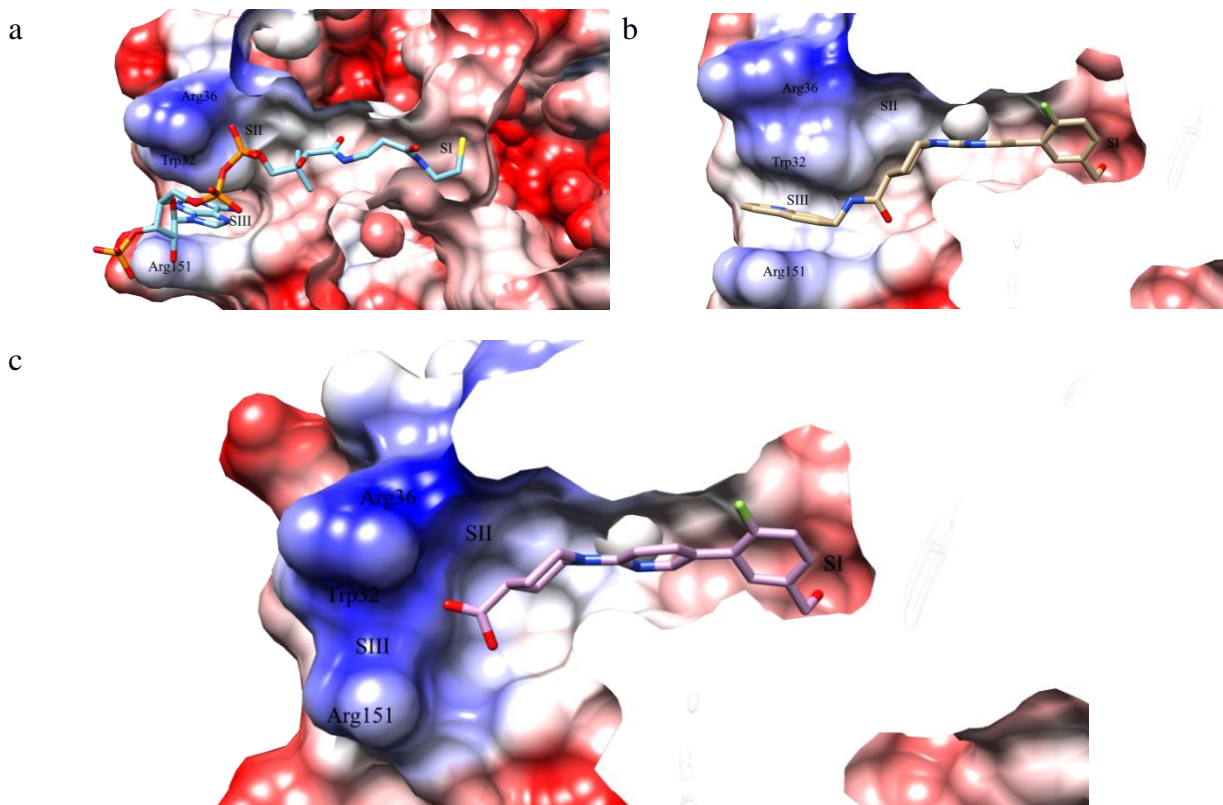
Fonte: Elaborado Pelo Autor.

Isto posto, a região SI é apresentada potencial de Coulomb predominantemente negativo e tem como seus principais aminoácidos a tríade catalítica Cys112, e His 244, Asn 274 (não demonstrado). A região SII tem os aminoácidos Arg 36, Arg 249, ASN 247 e Gly 209 e apresenta um potencial de Coulomb, em sua maior parte, positivo enquanto que a Região SIII normalmente

é alcançada somente pelos ligantes maiores e mantem um potencial de coulomb misto tendo como principais aminoácidos a Arg 151, Trp32 e Thr 26.

Outrossim, a depender do substituinte, a região SIII pode sofrer rearranjo dos seus aminoácidos e alterar a distância entre eles e as moléculas ligantes. Na figura 9a (PDB ID:1HNJ) e 9b (PDB ID: 5BNS) os grupos purina e quinolina, respectivamente, “escavam” a região SIII formando um bolsão de interação alocando os grupos em tela entre os aminoácidos Arginina 151 e triptófano 32. Quando na ausência destes grupos, e na presença de um grupo bastante polar, como o ácido carboxílico, Figura 9c (PDB ID: 5BNR), a Arginina 151 bem como a Arginina 36 e a Arginina 249 (região SIII) tendem direcionar-se para este grupo polar fechando este bolsão de interação.

Figura 9 – Regiões do Sítio Ativo



Fonte: Elaborado Pelo Autor.

É possível perceber que grupos importantes alinham-se nestas regiões. Esta condição faz suscitar diferentes hipóteses sobre a importância de cada região na formação de um melhor ligante competitivo para a enzima FabH.

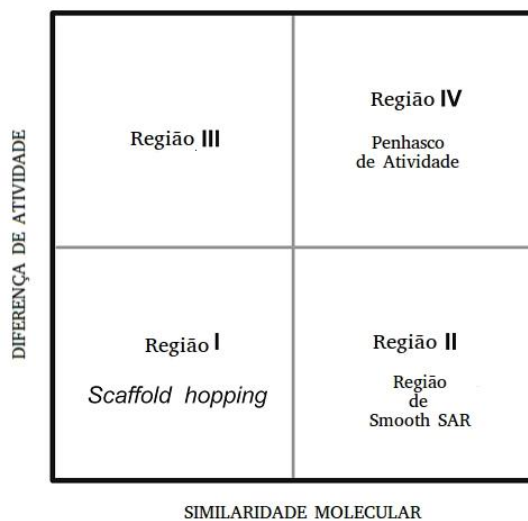
Dada a grande diferença estrutural entre os ligantes, fica difícil saber o impacto de determinado grupo na atividade biológica. Porém, em moléculas similares, pode-se encontrar alterações determinantes no papel inibidor destas moléculas, sendo essa característica uma das grandes vantagens em estudar *activity cliffs*.

2.5 – Activity Cliff

A metodologia QSAR 3D, em geral, realiza suas previsões através de um conceito consagrado na química medicinal: a similaridade estrutural. Este conceito versa que moléculas parecidas devem possuir atividade biológica semelhante (MARTIN;KOFRON; TRAPHAGEN, 2002). Assim sendo, espera-se que duas moléculas com semelhanças estruturais se liguem as mesmas regiões do sítio ativo e, por isso, possuam descritores semelhantes, culminando com aproximada atividade biológica. Porém, ao analisar o espaço amostral percebem-se pares ou conjuntos de moléculas estruturalmente semelhantes, que compartilham especificidade pelo mesmo sítio ativo, mas com uma pronunciada diferença em suas atividades biológicas (DIMOVA;BAJORATH, 2014). Para tanto, faz-se necessário definir que tipos de relações são possíveis dentre um conjunto de moléculas no tocante à similaridade e potência.

Na Figura 10, quando se comparam a relação similaridade *versus* diferença de atividade, percebe-se quatro regiões. A região I descreve uma situação particular, moléculas com baixa similaridade, e ao mesmo tempo, pequena diferença de atividade, esta relação descrita como “*scaffold hopping*” é de sobremaneira interessante quando o objetivo principal é a identificação de novos esqueletos moleculares. Na região II estão contidas moléculas muito parecidas e que, por isso, apresentam pequena diferença de atividade, enquanto o conjunto de moléculas da região III representa o contraponto exato, moléculas bastante diferentes e de larga diferença na atividade biológica. Nesta lógica, as regiões II e III representam os conjuntos mais comuns de dados os quais estão ancorados no princípio da similaridade molecular (PÉREZ-VILLANUEVA et al., 2015).

Figura 10- Relação entre a Diferença de Atividade e a Similaridade Molecular



Fonte: Adaptado de (PÉREZ-VILLANUEVA et al., 2015)

A Região IV configura uma área de *activity cliffs*, o qual define-se como um conjunto de moléculas com grande similaridade estrutural, porém de acentuada diferença de potência em suas atividades biológicas (PÉREZ-VILLANUEVA et al., 2015). Em estudos de QSAR frequentemente estas moléculas são tidas como pontos fora da curva, porém a percepção destes conjuntos, principalmente, durante os estágios iniciais de planejamento racional de novas moléculas pode contribuir para o desenvolvimento de novos fármacos (BAJORATH, 2017).

Os *activity cliff*, costumeiramente, são fruto de pequenas mudanças nos substituintes de um esqueleto molecular, porém cruciais para a potência, pois guiam regiões da molécula com maior potencial de substituição ou grupos para a otimização da atividade biológica (STUMPFE; BAJORATH, 2012)

A aplicação de metodologias de *activity cliff* deve ser cuidadosamente analisada para garantir que as informações advindas da mesma promovam real ganho na atividade biológica. Neste sentido são dois os critérios fundamentais na definição de um par de AC: o primeiro é como medir a similaridade entre duas moléculas o segundo critério é qual o valor que define uma diferença significativa de atividade (BAJORATH, 2017)

A forma como entendemos a similaridade, entre um conjunto de moléculas, é crucial para a identificação de um *activity cliff*. Esta similaridade costuma ser categorizada entre similaridade 2D e similaridade 3D, cada qual dividida em uma série de subcategorias. Estas subcategorias classificam diferenças no esqueleto, no substituinte ou no posicionamento de grupos diferenciais de um par de moléculas (MAGGIORA et al., 2014).

Na literatura a forma de menor custo computacional e que apresenta grande efetividade é a comparação das impressões digitais (*fingerprints*) no universo bidimensional o qual é conhecida como similaridade 2D (KLINGER;AUSTIN, 2006). As impressões digitais de uma molécula representam a presença ou ausência de um conjunto subestruturas mais comuns em grupos moleculares. A comparação entre estas impressões digitais pode ser feita através de uma série de metodologias como Tanimoto (HOLLIDAY; RANADE; WILLETT, 1995), Cosine (HOLLIDAY;RANADE; WILLETT, 1995), Hamming (WILLETT; BARNARD; DOWNS, 1998) entre outros. Destes, o coeficiente de Tanimoto o mais amplamente utilizado (WILLETT,2006).

Quanto a similaridade 3D é conferida através da comparação entre a topologia das superfícies eletrônicas de duas moléculas. Tendo em vista que as moléculas inevitavelmente possuem uma estrutura tridimensional este tipo de similaridade, em geral, possui um volume maior de informações do que a correspondente bidimensional, porém a facilidade em se trabalhar em análises bidimensionais além do custo computacional superior desta metodologia fazem com que a similaridade 2D seja mais amplamente utilizada (MAGGIORAet al., 2014).

A diferença de potência entre duas moléculas é um critério que depende de uma análise estatística entre os pares e a forma como a série se comporta no sítio ativo. Porém ao analisarmos o banco de dados, uma diferença de potência de duas ordens de grandeza, em valores normalizados, costuma ter significância estatística em diversos casos (BAJORATH, 2017).

2.6 – Structure–Activity Landscape Index (SALI)

Os *activity cliffs* ocorrem entre um par ou conjuntos de moléculas, todavia quando diante de um extenso conjunto de moléculas, buscar pares destas pode se tornar uma tarefa bastante dispendiosa. Isto posto, necessitam-se de mecanismos que atuem filtrando estes dados em busca de uma rápida localização destes pares moleculares.

Na literatura encontram-se várias abordagens que podem ser usadas para identificar ou quantificar *activity cliffs* (GUHA;VANDRIE, 2008). Dentre os primeiros esforços está a metodologia *molecular Matched Pair Analysis* (MMPA) que analisa moléculas que diferem em apenas uma simples transformação química, mas que possuem significativas mudanças em uma característica, como toxicologia ou atividade biológica (KENNY; SADOWSKI, 2005). Outra metodologia, mais abrangente, é a *Structure Activity Relationship Index* (SARI) (PELTASON; BAJORATH, 2007), o qual busca caracterizar e comparar os diferentes tipos de Relação Estrutura

Atividade usando dois tipos de escores para definir a estrutura bi dimensional (2D) e a atividade biológica normalizada como definidor de potência. Por fim, o *Structure–Activity Landscape Index* (SALI) por depender apenas de informações provenientes da estrutura e da potência das moléculas caracteriza-se como mais abrangente dos métodos (GUHA; VANDRIE, 2008).

A metodologia SALI é aplicada apenas para relações inibidor-receptor. Estas relações são quantificadas através da aplicação da equação (1). A equação é definida pelo módulo da diferença de atividade da molécula A pela molécula B, este resultado, dividido por 1 menos o valor de similaridade (Sim), entre as moléculas A e B.

$$SALI = \frac{|A-B|}{1-Sim} \quad (1)$$

O valor de atividade descrito na equação (1), para as moléculas “A” e “B”, normalmente refere-se ao Logaritmo da constante de inibição (K_i) ou concentração de inibição de 50% (IC_{50}). A similaridade é, usualmente, dada através do índice de Tanimoto, porém quando os valores são muito próximos a um, como nos casos de estereoisômeros, o índice SALI tende ao infinito. Nesses casos o SALI deve ser reajustado para os maiores valores coerentes (GUHA; VANDRIE, 2008).

3.0 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

- Utilizar a vasta informação da literatura sobre a interação de inibidores competitivos da enzima FabH para a descoberta de padrões estruturais que complementem a literatura no desenvolvimento de novos análogos mais potentes.

3.2 – Objetivos Específico

- Criar um banco de dados de estruturas e atividade biológica para inibidores da Enzima FabH da *E. coli*.
- Descobrir padrões estruturais críticos para a atividade biológica de inibidores da FabH utilizando *activity cliff*.
- Propor, através de estudos de dinâmica molecular, a melhor maneira como moléculas sem estrutura cristalografada interagem com sítio ativo.

4.0 – MATERIAL E MÉTODOS

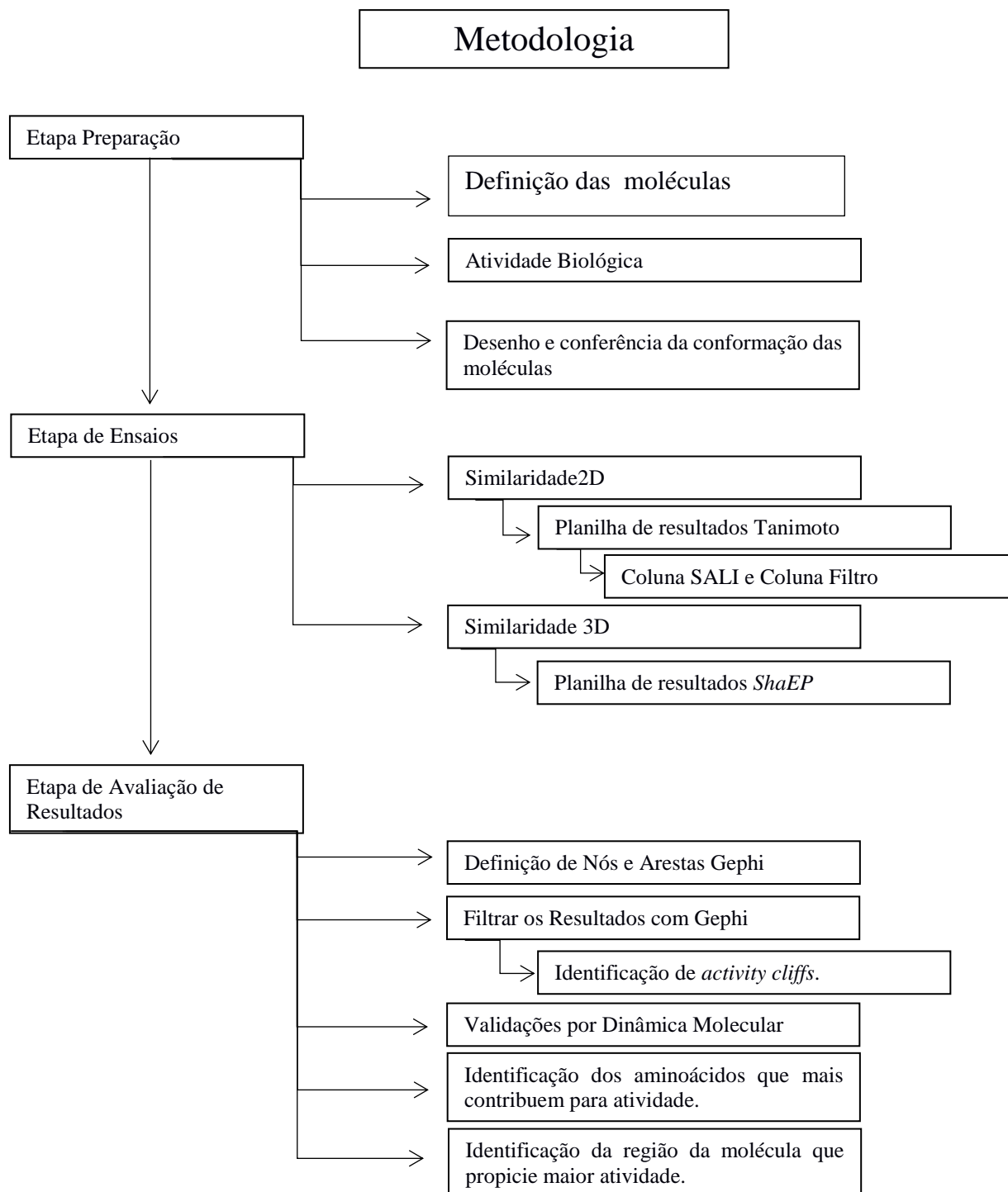
4.1 Material

Todo o projeto foi desenvolvido utilizando o *hardware*: Notebook modelo DELL Inspiron 5548, processador Intel Core i7-5500, 2.40 GHz, 8,GB RAM, HD 1 TB. O projeto foi desenvolvido, principalmente, na plataforma Linux Mint 18. Os principais softwares utilizados eram de licença livre ou a Universidade Federal do Rio Grande do Norte dispunha da licença. Eram eles: Chimera (PETTERSEN et al., 2004), GROMACS 4.6.5 (VAN DER SPOEL et al., 2005), Gephi v.0.9.1 (BASTIAN; HEYMANN; JACOMY, 2009) MarvinSketch versão 15.9 da ChemAxon, OpenBabel (O'BOYLE et al., 2011), pharmacophore (KORB et al., 2010), ShaEP (VAINIO; PURANEN; JOHNSON, 2009), Swissparam (VINCENT ZOETE, MICHEL A. CUENDET, AURÉLIEN GROSDIDIER, 2011).

4.1.1– Metodologia

Considerando o número elevado de etapas executadas no decorrer deste trabalho, na figura 11 encontra-se resumido o fluxograma das atividades, o qual pode servir de referência no acompanhamento da metodologia.

Figura 11– Fluxograma de Atividades.



Fonte: Elaborado Pelo Autor.

4.2 Etapa Preparação.

4.2.1 – Definição das moléculas

Após uma exaustiva busca na literatura foram selecionadas 233 moléculas de 15 artigos diferentes, todas com atividade biológica testada *in vitro*. As moléculas escolhidas deveriam ter atividade inibitória comprovada contra cepas de *Escherichia coli*, e terem sido testadas a partir de um mesmo protocolo de inibição (LI et al., 2009); (ZHANG et al., 2011); (LI et al., 2012); (LI et al., 2013); (ALHAMADSHEH et al., 2007); (LV et al., 2010); (YANG et al., 2012); (SONG et al., 2014); (WANG et al., 2012); (LI et al., 2014); (MCKINNEY et al., 2016a); (CHENG et al., 2009); (CHENG et al., 2010); (CHENG;XUE; ZHU, 2013); (LI et al., 2010).

Inicialmente só foram consideradas as atividades biológicas para cepas de *E.coli*, mas sendo uma rota biológica comum a todas as bactérias, posteriormente outras espécies serão consideradas. As estruturas de todas as moléculas e suas respectivas atividades biológicas estão disponíveis na Seção 5.1 “Banco de moléculas FabH”.

4.2.2 – Atividade Biológica

O teste escolhido para determinar a atividade biológica foi o IC_{50} . O resultado, extraído da literatura, para cada molécula foi convertido para a escala micromolar e em seguida linearizada através da Equação (2):

$$pIC_{50} = -\log(IC_{50}) \quad (2)$$

Outrossim, os testes biológicos descritos na literatura para mensurar o IC_{50} encontram-se no anexo I.

4.2.3 – Desenho e conferência da conformação das moléculas

Utilizou-se o software MarvinSketch (Marvin 15.9.21, 2015, ChemAxon) para o desenho das estruturas, atribuição de estado de protonação e escolha da conformação de menor energia. O estado de protonação foi estimado para $pH = 7,40$, o mesmo utilizado no anexo I. A avaliação espacial das estruturas foi realizada pelo software UCSF Chimera (PETTERSEN et al., 2004).

4.3 Etapa de Ensaio.

Após a etapa de preparação construiu-se uma tabela com os códigos representando cada molécula e o correspondente valor de pIC_{50} . A referida tabela foi utilizada em todas as etapas posteriores dando origem a três tipos de ensaios. Uma análise de similaridade 2D através da similaridade de Tanimoto, um ensaio de similaridade 3D a partir da metodologia *ShaEP* (*superimposition and similarity analysis of molecules*) (VAINIO; PURANEN; JOHNSON, 2009) e como a planilha de nós na análise do programa Gephi (BASTIAN; HEYMANN; JACOMY, 2009).

4.3.1 Similaridade de 2D

O software Openbabel (O'BOYLE et al., 2011) foi utilizado para calcular a similaridade de Tanimoto (equação 03). Nesta equação “a” representa as subestruturas presentes na molécula A, “b” as subestruturas presentes na molécula B e “c” as subestruturas comuns às duas moléculas.

$$Tanimoto(Tc) = \frac{(c)}{(a+b-c)} \quad (3)$$

As subestruturas são uma série de pequenos conjuntos de átomos, os quais visam, a partir de sua combinação, representar os mais diversos tipos de moléculas. Como estes átomos não definem a posição espacial das moléculas, mas apenas os átomos que as compõem esta similaridade é dita 2D.

4.3.1.1 Planilha de Resultados Tanimoto

As 233 moléculas foram comparadas entre si, um par por vez, através de *script* próprio disponível no anexo II. Este *script* automatizou o cálculo da similaridade de Tanimoto, descrito na sessão acima, e alinhou os resultados no formato de uma planilha conforme demonstrado na figura 12. Nesta figura (figura 12) “*Source*” representa a ID da molécula A no cálculo da equação (3), enquanto “*Target*” a ID da molécula B nesta mesma equação. Como o valor de similaridade na comparação de A com B é mesmo da comparação de B com A, a coluna *Type* representa esta similaridade “*Undirected*”.

A coluna “TANIMOTO” define o resultado da similaridade entre as moléculas “*Source*” e *Target*”, enquanto que as colunas AB_S e AB_T representam o valor de pIC₅₀ para as moléculas na coluna “*Source*” e “*Target*” respectivamente (Figura 12).

Figura 12 – Planilha de Atividades.

Source	Target	Type	TANIMOTO	AB_S	AB_T
1	2	Undirected	0.363636	5.31	4.15
1	3	Undirected	0.298507	5.31	4.82
1	4	Undirected	0.302632	5.31	4.68
1	5	Undirected	0.604167	5.31	3.42
1	6	Undirected	0.403226	5.31	5.22
1	7	Undirected	0.403226	5.31	6.21
1	8	Undirected	0.363636	5.31	4.13
1	9	Undirected	0.333333	5.31	3.88
1	10	Undirected	0.434783	5.31	5.46

Fonte: Elaborado Pelo Autor.

4.3.1.2 SALI

A partir da planilha de resultados obtida no item 4.3.1.1 foram adicionadas duas colunas. A primeira com o nome “SALI” e a segunda com o nome “Filtro” (figura 10). Na coluna SALI procedeu-se o cálculo da equação 5 em que A representa o pIC₅₀ da molécula “*source*” e, B corresponde o valor de pIC₅₀ da molécula “*Target*” enquanto que Tc representa a similaridade de Tanimoto.

$$SALI_{tc} = \frac{(|A-B|)}{(1-Tc)} \quad (5)$$

Considerando os casos em que as moléculas são suficientemente semelhantes para obter valor “1” de similaridade o que envolveria um erro no cálculo da formula SALI, utilizou-se no lugar da expressão “1-Sim” o denominador “1,05 – Sim” assim evitando maiores problemas na geração da planilha ao dividir por “0”

4.3.1.3 – Coluna Filtro

Os resultados da coluna “SALI” foram filtrados através da equação 06. Este procedimento faz-se necessário tendo em vista que os valores de SALI muitas vezes são influenciados por valores muito discrepantes no numerador, diferença de atividade, gerando valores de SALI elevados para moléculas não muito similares ou moléculas com um valor de Tc muito próximo de 1, o que poderia gerar um denominador muito baixo culminando com um alto valor de SALI para moléculas que não apresentam grande diferença de atividade.

$$\text{FILTRO} = \text{SALI}_{\text{tc}} > 6,85; Tc > 0,75; |A - B| > 1,8 \quad (6)$$

O valor de SALI superior a 6,85 corresponde ao resultado do teste lógico descrito na equação 6 para uma molécula que cumpre as regras de similaridade e de pIC₅₀. A coluna Filtro, portanto, resume teste lógico, citadas acima, em duas categorias atribuindo valor “0” para o par de moléculas que não atende as exigências do teste lógico e o valor “1” para o par de moléculas que cumprem as regras citadas.

Figura 13 – Planilha resultados SALI E FILTRO

Source	Target	Type	TANIMOTO	AB_S	AB_T	SALI	FILTRO
1	2	Undirected	0,363636	5,31	4,15	1,69	0
1	3	Undirected	0,298507	5,31	4,82	0,65	0
1	4	Undirected	0,302632	5,31	4,68	0,84	0
1	5	Undirected	0,604167	5,31	3,42	4,24	0
1	6	Undirected	0,403226	5,31	5,22	0,14	0
1	7	Undirected	0,403226	5,31	6,21	1,39	0
1	8	Undirected	0,363636	5,31	4,13	1,72	0
1	9	Undirected	0,333333	5,31	3,88	2,00	0
1	10	Undirected	0,434783	5,31	5,46	0,24	0

Fonte: Elaborado Pelo Autor.

4.3.2 – Similaridade 3D

As moléculas do banco de dados, foram comparadas em pares através da similaridade 3D. Esta comparação utilizou-se da combinação entre duas abordagens: A primeira visava alinhar as moléculas através do algoritmo “pharmACOpore”, conforme descrito por Oliver Korb e colaboradores (KORB et al., 2010) e, a partir das estruturas sobrepostas, calcular a similaridade,

entre as moléculas deste par, através da metodologia “*ShaEP*” (*Shape and Electrostatic Potencial*) (VAINIO; PURANEN; JOHNSON, 2009).

4.3.2.1 – Planilha de resultados *ShaEP*

A construção da planilha de resultados ocorreu de maneira similar a planilha de resultados da similaridade 2D, porém o valor de similaridade de Tanimoto foi substituído pelo valor de similaridade dado pelo *ShaEP*.

O valor de similaridade, fruto desta abordagem, foi definido como a similaridade 3D, tendo em vista que o alinhamento das moléculas dado pelo software pharmACOpore, e o valor de similaridade obtido com o *ShaEP*, avaliam as moléculas em suas conformações tridimensionais. O valor de *ShaEP* é composto da análise do potencial eletrostático, a partir do melhor alinhamento entre os grafos formados pelos grupos moleculares.

As mesmas moléculas da similaridade 2D foram comparadas entre si, um par por vez, através de script próprio, disponível no anexo III. Este script automatizou tanto o alinhamento promovido pelo pharmACOpore, como o cálculo da similaridade de *ShaEP*. O script supracitado escreve o resultado em uma planilha própria, com os mesmos identificadores da similaridade 2D, (figura 11), excetuando-se a coluna “TANIMOTO” que foi substituída pela coluna “*ShaEP*”.

Figura 14– Planilha resultados *ShaEP*

Source	Target	Type	ShaEP	AB_S	AB_T
1	2	Undirected	0.642479	5.31	4.15
1	3	Undirected	0.877548	5.31	4.82
1	4	Undirected	0.84596	5.31	4.68
1	5	Undirected	0.788059	5.31	3.42
1	6	Undirected	0.75047	5.31	5.22
1	7	Undirected	0.687032	5.31	6.21
1	8	Undirected	0.639352	5.31	4.13
1	9	Undirected	0.693225	5.31	3.88
1	10	Undirected	0.675212	5.31	5.46

Fonte: Elaborado Pelo Autor.

4.3.2.2 – $SALI_{ShaEP}$ e Filtro.

Assim como na etapa anterior, criou-se uma coluna $SALI_{ShaEP}$ e uma coluna Filtro. A coluna $SALI_{ShaEP}$ seguiu a mesma equação base da equação 05, porém substituindo o valor de T_c pela valor da coluna $ShaEP$, conforme equação 07.

$$SALI_{ShaEP} = \frac{(|A-B|)}{(1-SIM_{ShaEP})} \quad (7)$$

A coluna Filtro também tem correspondências com a coluna filtro dada na planilha de similaridade 2D, porém com novos critérios no teste lógico, haja vista que os valores de similaridade entre Tanimoto e $ShaEP$ apresentam diferenças quanto ao seu valor.

$$FILTRO = SALI_{ShaEP} > 20; ShaEP > 0,90; |A - B| > 2,0 \quad (8)$$

O valor de $SALI_{ShaEP}$ superior a 20 corresponde ao resultado que diz respeito a moléculas 90% similares, com diferença de pIC_{50} maior que duas ordens de grandeza. A coluna Filtro, portanto, resume este teste lógico, equação 8, em duas categorias, atribuindo valor “0” para o par de moléculas que não atende as exigências e o valor “1” para o par de moléculas que cumpre as regras citadas.

4.4 Etapa de Avaliação dos Resultados

4.4.1 Definição de Nó e Aresta Gephi

O programa Gephi (BASTIAN; HEYMANN; JACOMY, 2009) ajuda a traduzir as informações presentes nas planilhas de resultados em uma informação gráfica, mas facilmente compreensível e acessível. Neste sentido, o programa Gephi utiliza-se de duas planilhas para traduzir esta informação em grafos. Uma planilha chamada “nó” irá identificar as moléculas no grafo. A planilha utilizada como nó foi descrita na seção 4.3. A segunda planilha chamada de “aresta” irá conter as relações entre as moléculas que compõe os nós.

Como planilha “aresta” foram utilizadas as planilhas de resultados Tanimoto e a planilha de resultados $ShaEP$ descritas, respectivamente, nas seções 4.3.1.1 e 4.3.2.1. Outrossim, as duas planilhas foram utilizadas após a adição das colunas $SALI$ e Filtro.

A junção de uma planilha “nó” com uma planilha “aresta” gera um grafo no programa Gephi, portanto, foram gerados dois grafos neste trabalho, um com a similaridade de Tanimoto e outro com a similaridade *ShaEP*. Em cada grafo gerado os pares moleculares que obtiveram resultado “1”, na coluna Filtro, são identificadas como *Activity Cliffs*.

Os *Activity Cliffs* identificados a partir do grafo da planilha de resultados de Tanimoto foram discutidos a partir de sua composição atômica. Enquanto que as moléculas que compõem os *Activity Cliffs* identificados através da metodologia *ShaEP* foram submetidos a estudos de dinâmica molecular.

4.4.2 Dinâmica Molecular

4.4.2.1 Etapa Inicial

A estrutura cristalográfica da enzima B-Cetoacil-ACP Sintase III, ligada a um inibidor (código PDB: 5BNS) foi utilizada como receptor para o estudo de dinâmica molecular. Para esta enzima, que possui duas subunidades, apenas a cadeia “A” foi utilizada na simulação.

O ligante cristalografado foi utilizado para ajustar a posição de entrada (input) da molécula proveniente do *Activity Cliff*. A posição do ligante no interior da enzima manteve-se inalterada, enquanto as moléculas do AC foram sobrepostas através do programa pharmACOpore (KORB et al., 2010), conforme script próprio disponível no anexo IV. A posição de ancoragem proveniente do script, para estas moléculas, foi refinada através de docagem manual utilizando-se o software Chimera. Por fim, a topologia para as moléculas do AC foi calculada através do site Swissparam (VINCENT ZOETE, MICHEL A. CUENDET, AURÉLIEN GROSDIDIER, 2011) (<http://www.swissparach/>) com o intuito de realizar as simulações de dinâmica molecular.

4.4.2.2 Etapa de Simulação

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas a partir do pacote GROMACS 5 (VAN DER SPOEL et al., 2005). A simulação ocorre dentro de uma caixa teórica de pelo menos 10Å entre o soluto (complexo enzima-molécula) e as paredes da caixa. Em seguida é adicionado modelo de solvente água, sendo a carga geral do sistema equilibrada com a adição de moléculas de Cl⁻ e Na⁺. O tratamento eletrostático desta e das demais etapas foi dada pela metodologia *Particle Mesh Ewald* (PME). A simulação desenvolveu-se por 20 000 passos em pressão constante de 1 bar pelo barostato Parrinello-Rahmane e temperatura de 300k pelo termostato de Berendsen. A

integração foi realizada passo a passo em intervalos de 1 fs. Todos os complexos tiveram sua energia otimizada usando o algoritmo de descida mais inclinada (*Steepest Descent Algorithm* - SDA). O critério de convergência empregado nas otimizações foi que a força máxima que agisse sobre os átomos não superasse $10 \text{ kJmol}^{-1} \text{ nm}^{-1}$. As diversas posições de saída (output) foram avaliadas através das energias de interação curto alcance (Vizinhaça-Ligante) de Coulomb e Lenard-Jones, e escolhidas as que apresentaram menor valor depois de estabilizado o sistema.

4.4.3 – Visualização dos resultados

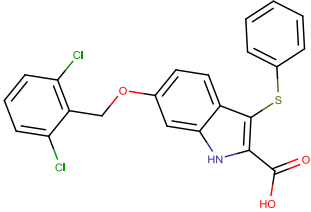
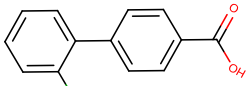
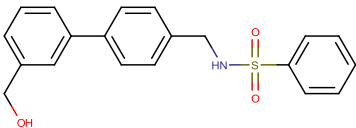
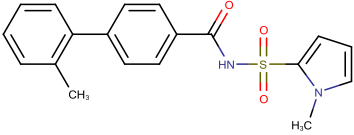
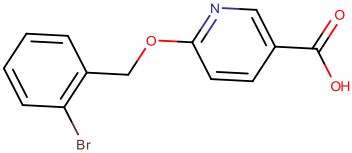
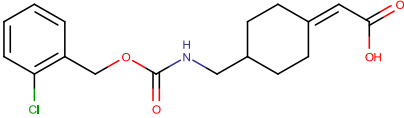
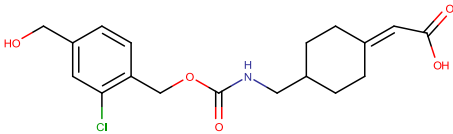
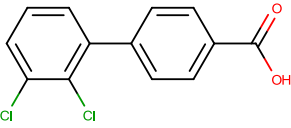
Por fim, as moléculas provenientes dos AC foram inicialmente avaliadas visualmente em seguida, comparadas quanto a sua composição estrutural. Aquelas que tiveram estudos de dinâmica molecular foram comparadas quanto a posição de ancoragem *in silico* na enzima FabH.

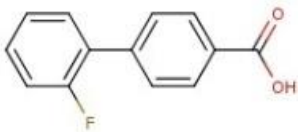
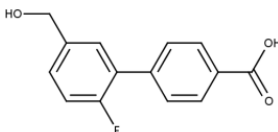
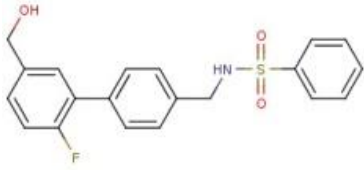
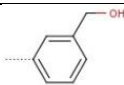
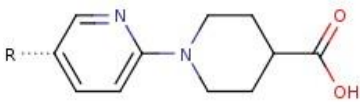
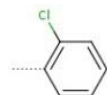

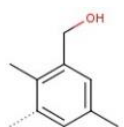
5.0 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

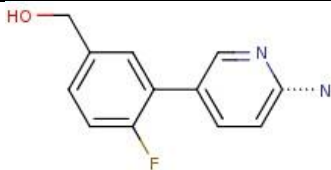
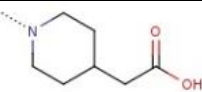
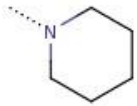
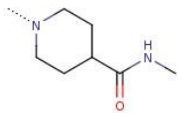
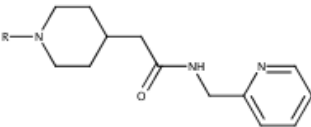
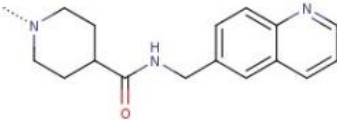
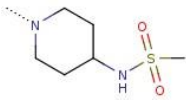
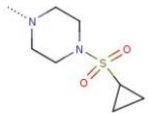
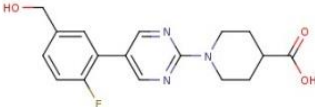
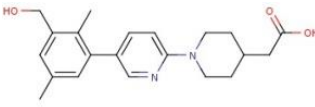
5.1 – Banco de Moléculas FabH

233 moléculas de 15 artigos foram utilizadas para formação do banco de dados, os quais poderão ser visualizados na Tabela 01. As moléculas foram divididas conforme o artigo de origem, e a atividade biológica está presente na forma de pIC₅₀.

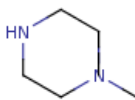
Tabela 01– Banco de Moléculas FabH

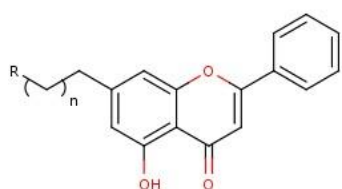
Moléculas acs22016 – Artigo (MCKINNEY et al., 2016)			
Núcleo base	Molécula / Substituintes	pIC ₅₀	ID
		02=5,31	01
02	05	05=4,15	02
		06=4,82	03
06	07	07=4,68	04
		08=3,42	05
08	15	15=5,22	06
		17=6,21	07
17	18	18=4,15	08

 19	 20	19=3,88	09
		20=5,46	10
 21	 22	21=5,08	11
 22-29	 23	5,77	12
	 24	6,28	13
	 25	5,66	14
	 26	6,54	15
	 27	5,96	16
	 28	5,14	17
	 29	7,26	18
		6,80	19
		6,74	20

 31-41	 31		
	 33	5,48	21
	 34	5,09	22
	 35	6,05	23
	 36	7,02	24
	 38	5,26	25
	 39	5,24	26
	 40	5,80	27
 41		7,32	28

Moléculas bmc172009 - Artigo (LI et al., 2009)

Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
2a , 3a R=		2a=4,95	29
		3a=5,18	30



2a-2i, n=2

3a-3i, n=3

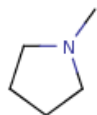
2b, R= N(CH₂CH₃)₂

2b=4,15 31

2c, R= NHCH₂CH₂CH₃

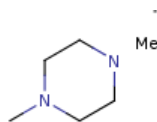
2c=4,27 32

3g, R=



3g=5,51 33

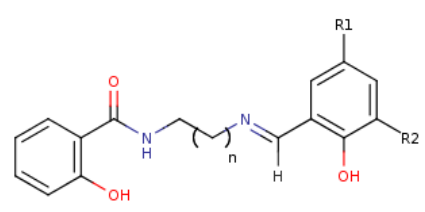
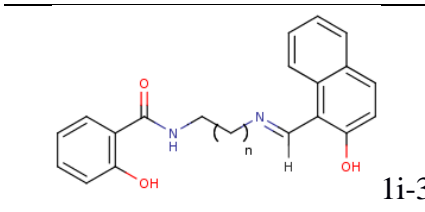
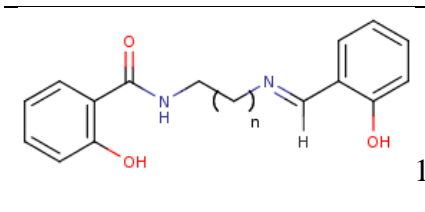
3e, R=

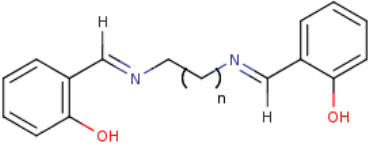


3e=5,28 34

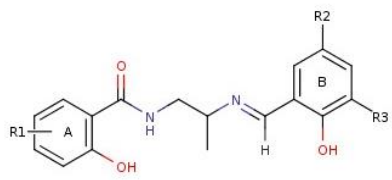
Moléculas bmc17200920 – Artigo (CHENG et al., 2009)

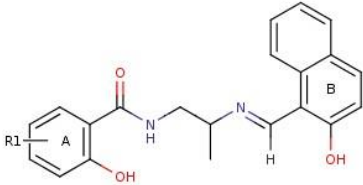
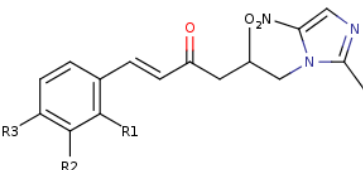
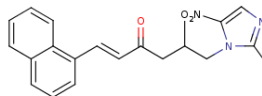
Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
	1a, R ₁ = H, R ₂ =H	5,14	35
	1b, R ₁ = F, R ₂ =H	4,99	36
	1c, R ₁ = Cl, R ₂ =H	5,56	37
	1d, R ₁ = Br, R ₂ =H	5,21	38
	1e, R ₁ = I, R ₂ =H	5,95	39
	1f, R ₁ = Cl, R ₂ =Cl	5,60	40
	1g, R ₁ = Br, R ₂ =Br	6,27	41
	1h, R ₁ = I, R ₂ =I	4,90	42
	2a, R ₁ = H, R ₂ =H	4,90	43
	2b, R ₁ = F, R ₂ =H	5,75	44
	2c, R ₁ = Cl, R ₂ =H	5,79	45
	2d, R ₁ = Br, R ₂ =H	6,48	46
	2e, R ₁ = I, R ₂ =H	5,82	47
	2f, R ₁ = Cl, R ₂ =Cl	5,56	48

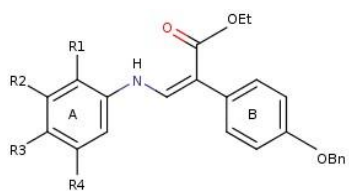
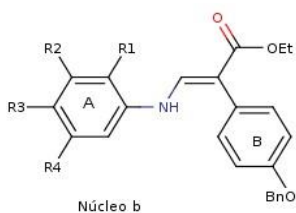
	2g, R ₁ = Br, R ₂ =Br	5,20	49
	2h, R ₁ = I, R ₂ =I	4,89	50
	3a, R ₁ = H, R ₂ =H	4,87	51
	3b, R ₁ = F, R ₂ =H	5,20	52
	3c, R ₁ = Cl, R ₂ =H	5,63	53
	3d, R ₁ = Br, R ₂ =H	5,20	54
	3e, R ₁ = I, R ₂ =H	6,19	55
	3f, R ₁ = Cl, R ₂ =Cl	5,53	56
	3g, R ₁ = Br, R ₂ =Br	5,51	57
	3h, R ₁ = I, R ₂ =I	5,20	58
n= 1, 1a-1k			
n=2, 2a- 2k			
n=3, 3a- 3k			
n=5, 4a- 4k			
	4a, R ₁ = H, R ₂ =H	4,65	59
	4b, R ₁ = F, R ₂ =H	4,40	60
	4c, R ₁ = Cl, R ₂ =H	5,00	61
	4d, R ₁ = Br, R ₂ =H	4,90	62
	4e, R ₁ = I, R ₂ =H	4,58	63
	4h, R ₁ = Cl, R ₂ =Cl	4,82	64
	4g, R ₁ = Br, R ₂ =Br	5,20	65
	1i, n=2	5,01	66
	2i, n=3	5,52	67
	3i, n=4	5,51	68
	1j, n=2	4,78	69
	2j, n=3	4,88	70
	3j, n=4	4,90	71

	2k, n=3	4,91	72
 2k-4k	3k, n=4	4,88	73
	4k, n=6	4,84	74

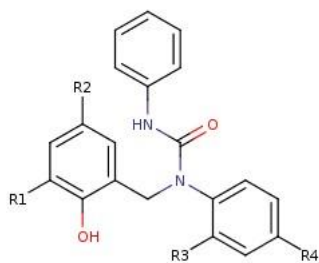
Moléculas bmc182010 – Artigo (CHENG et al., 2010)

Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
	1a, R ₁ = H, R ₂ =H , R ₃ = H,	5,09	75
	1b, R ₁ = H, R ₂ =F , R ₃ = H,	4,92	76
	1c R ₁ = H, R ₂ =Cl, R ₃ = H,	5,26	77
	1d, R ₁ = H, R ₂ =Br, R ₃ = H,	5,22	78
	1e, R ₁ = H, R ₂ =I , R ₃ = H,	6,11	79
	1f, R ₁ = H, R ₂ =Cl, R ₃ = Cl,	6,51	80
	1g, R ₁ = H, R ₂ =Br, R ₃ = Br,	5,50	81
	1h, R ₁ = H, R ₂ =I, R ₃ = I,	5,59	82
 1a -1h, 2b -2f, 3a- 3h	2b, R ₁ = 5-Br, R ₂ =F, R ₃ = H,	4,66	83
	2d, R ₁ = 5-Br, R ₂ =Br , R ₃ = H,	4,78	84
	2e, R ₁ = 5-Br, R ₂ =I, R ₃ = H,	5,03	85
	2f, R ₁ = 5-Br, R ₂ =Cl, R ₃ = Cl,	5,06	86
	3a, R ₁ = 4-Me, R ₂ =H, R ₃ = H,	5,10	87
	3b, R ₁ = 4-Me, R ₂ =F, R ₃ = H,	5,25	88
	3c, R ₁ = 4-Me, R ₂ =Cl, R ₃ = H,	5,06	89
	3d, R ₁ = 4-Me, R ₂ =Br, R ₃ = H,	5,20	90
	3e, R ₁ = 4-Me, R ₂ =I, R ₃ = H,	6,35	91
	3f, R ₁ = 4-Me, R ₂ =Cl, R ₃ = Cl,	5,76	92

	3g, R ₁ =4-Me, R ₂ =Br, R ₃ = Br,	5,27	93
	3h, R ₁ =4-Me, R ₂ =I, R ₃ = I,	4,83	94
 <p>1i-3i</p>	1i, R ₁ =H	4,70	95
	2i, R ₁ =5-Br	4,96	96
	3i, R ₁ =4-Me	5,33	97
Moléculas bmc192011 - Artigo(ZHANG et al., 2011)			
Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
	3d, R ₁ = Br, R ₂ = H, R ₃ = H	4,40	98
	3f, R ₁ = H, R ₂ = F, R ₃ = H	5,09	99
	3g, R ₁ = H, R ₂ = Br, R ₃ = H	4,56	100
 <p>3d-3q</p>	3j, R ₁ = H, R ₂ = H, R ₃ = Cl	4,46	101
	3k, R ₁ = H, R ₂ = H, R ₃ = Br	4,81	102
	3n, R ₁ = H, R ₂ = H, R ₃ = Ph	5,60	103
	3o, R ₁ = H, R ₂ = H, R ₃ = OBn	5,17	104
	3p, R ₁ = H, R ₂ = H, R ₃ = N(CH ₃) ₂	4,70	105
	3q, R ₁ = Cl, R ₂ = H, R ₃ = Cl	5,03	106
		4,31	107
3r			
	6a, R ₁ = H, R ₂ = H, R ₃ = Br, R ₄ =H	5,48	108
	7a, R ₁ = H, R ₂ = H, R ₃ = CH ₃ , R ₄ =H	5,59	109
	8a, R ₁ = Br, R ₂ = H, R ₃ = Br, R ₄ =H	4,62	110

6a -10^a9a, R₁= Cl, R₂= H, R₃= H, R₄ =H 4,55 11110a, R₁= H, R₂= H, R₃= F, R₄ =H 5,09 1126b, R₁= H, R₂= H, R₃= Br, R₄ =H 6b=4,37 113

6b-12b

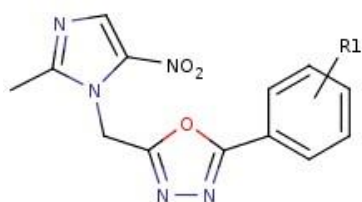
12b, R₁= H, R₂= H, R₃= CH(CH₃)₂, R₄ =H 12b=5,07 114

17-28

17, R₁= H, R₂=Br, R₃= F, R₄ =H 4,43 11518, R₁= H, R₂= Br, R₃= H, R₄ =F 5,18 11619, R₁= H, R₂= Br, R₃= Cl, R₄ =H 4,66 11720, R₁= H, R₂= Br, R₃= H, R₄ =Cl 5,33 11821, R₁= H, R₂= Br, R₃= Br, R₄ =H 4,25 11922, R₁= H, R₂= Br, R₃= H, R₄ =Br 4,39 12026, R₁= Br, R₂= Br, R₃= H, R₄ =F 4,14 12127, R₁= Br, R₂= Br, R₃= Cl, R₄ =H 4,29 12228, R₁= Br, R₂= Br, R₃= H, R₄ = Cl 5,00 123

Moléculas bmc202012 – Artigo (LI et al., 2012)

Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
	04, R ₁ = 4-F	4,73	124
	05, R ₁ = 4-Cl	4,55	125
	06, R ₁ = 4-Br	4,36	126



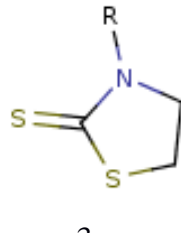

04-12	08, R ₁ = 4-Br	4,77	127
	09, R ₁ = 4-NO ₂	4,39	128
	10, R ₁ = 3-OCH ₃	5,03	129
	11, R ₁ = 2-OCH ₃	5,37	130
	12, R ₁ = 2-CH ₃	5,29	131

Moléculas bmc212013 – Artigo (LI et al., 2013)

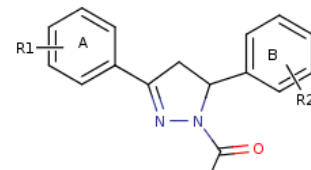
Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
<p>The structure shows a pyrazole ring with a methyl group at position 4 and a nitro group at position 3. A methylene group connects the nitrogen at position 1 to a carbonyl group. The carbonyl group is further connected to a phenyl ring substituted with R1 at the para position.</p>	01, R ₁ = 4-F	4,23	132
	04, R ₁ = 4-OCH ₃	5,35	133
	07, R ₁ = 4-CH ₃	5,21	134
	08, R ₁ = 4-N(CH ₃) ₂	4,80	135
	15, R ₁ = 2-F	4,32	136
	16, R ₁ = 2-NO ₂	4,70	137
	17, R ₁ = 2-OCH ₃	4,37	138
	19, R ₁ = 3,4-2OCH ₃	5,06	139
	20, R ₁ = 3,4,5-3CH ₃	5,64	140

Moléculas bmcl172007 – Artigo (ALHAMADSHEH et al., 2007)

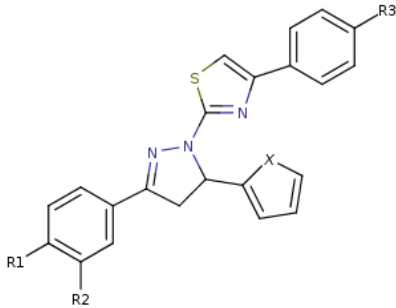
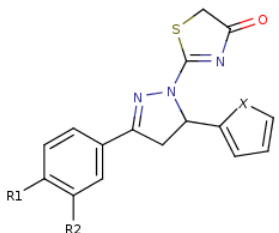
Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
<p>The structure shows a thiazolidine ring with a sulfonamide group at position 2 and a methyl group at position 4. The sulfonamide group is further connected to a phenyl ring substituted with R at the para position.</p>	1a, Ph-CH ₂	5,96	141
	1b, Ph-CH ₂ CH ₂	5,72	142
	1c, CH ₃	4,00	143
	1d, CH ₃ CH ₂ CH ₂	4,00	144

	1	1f-, Ph-O-Ph-CH ₂	6,05	145
		1g, C ₅ H ₉ -Ph-O-Ph-CH ₂	5,62	146
		3a, Ph-CH ₂	4,00	147
		3b, Ph-CH ₂ CH ₂	4,00	148
		3c, CH ₃	4,00	149
		3d, CH ₃ CH ₂ CH ₂	4,00	150
		3e, 3-pyridyl-CH ₂	4,00	151
		3f, Ph-O-Ph-CH ₂	4,00	152
		3g, 1g- C ₅ H ₉ -Ph-O-Ph-CH ₂	4,75	153
		4a, Ph-CH ₂	4,86	154
		4e, 3-pyridyl-CH ₂	4,68	155
		4f, Ph-O-Ph-CH ₂	4,96	156
		4g, 1g- C ₅ H ₉ -Ph-O-Ph-CH ₂	4,84	157

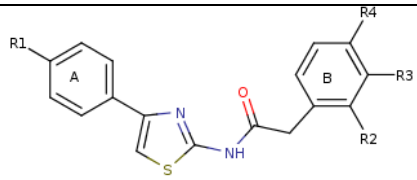
Moléculas bmcl202010 – Artigo (LV et al., 2010)

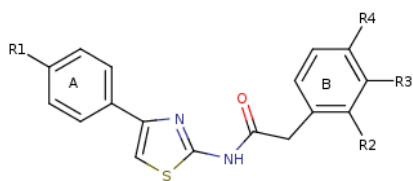
Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
	12, R ₁ = 4-OCH ₃ , R ₂ = 4-F	5,38	158
	13, R ₁ = 4-OCH ₃ , R ₂ = 4-Cl	5,12	159
	14, R ₁ = 4-OCH ₃ , R ₂ = 4-Br	4,98	160
	15, R ₁ = 4-OCH ₃ , R ₂ = 4-CH ₃	4,76	161
	16, R ₁ = 4-OCH ₃ , R ₂ = 4- OCH ₃	4,71	162
	17, R ₁ = 4-OCH ₃ , R ₂ = 2-Cl	4,50	163
	18, R ₁ = 4-OCH ₃ , R ₂ = 4-H	4,33	164

Moléculas bmcl222012 – Artigo (YANG et al., 2012)

Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
 <p>C</p>	c2, R ₁ = Br, R ₂ =H , R ₃ = H, X=S	4,63	165
	c3, R ₁ = Cl, R ₂ = Cl , R ₃ = H, X=S	3,82	166
	c4, R ₁ = CH ₃ , R ₂ =H, R ₃ = H, X=S	4,96	167
	c5, R ₁ = OCH ₃ , R ₂ =H, R ₃ = H, X=S	4,51	168
	c8, R ₁ = Cl, R ₂ =Cl, R ₃ =OCH ₃ , X=S	3,82	169
	c11, R ₁ = F, R ₂ =H , R ₃ = H, X=O	4,65	170
	c12, R ₁ = Br, R ₂ =H , R ₃ = H, X=O	5,01	171
	c14, R ₁ = CH ₃ , R ₂ =H , R ₃ = H, X=O	5,34	172
	c16, R ₁ = Br, R ₂ =H , R ₃ = OCH ₃ , X=O	4,71	173
	c18, R ₁ = CH ₃ , R ₂ =H , R ₃ = OCH ₃ , X=O	4,80	174
 <p>D</p>	d2, R ₁ = Br, R ₂ =H, X=S	4,57	175
	d4, R ₁ = CH ₃ , R ₂ =H, X=S	4,87	176
	d5, R ₁ = OCH ₃ , R ₂ =H, X=S	4,05	177
	d6, R ₁ = F, R ₂ =H, X=O	5,08	178
	d9, R ₁ = CH ₃ , R ₂ =H, X=O	4,74	179

Moléculas bmcl232013 – Artigo (CHENG;XUE; ZHU, 2013)

Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
 <p>3b-4g</p>	3b, R ₁ = H, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =F	4,46	180
	3c, R ₁ = H, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =Cl	4,38	181
	3e, R ₁ = H, R ₂ =H, R ₃ = Cl, R ₄ =H	4,91	182
	3f, R ₁ = H, R ₂ =H, R ₃ = Br, R ₄ =H	4,57	183



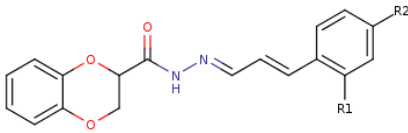
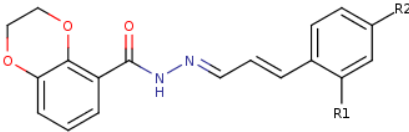
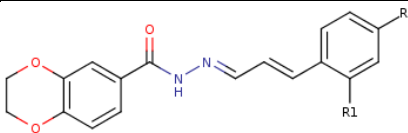
3b-4g

4b, R ₁ = Br, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =F	4,53	184
4c, R ₁ = Br, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =Cl	4,46	185
4d, R ₁ = Br, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =Br	4,32	186
4e, R ₁ = Br, R ₂ =H, R ₃ = Cl, R ₄ =H	5,28	187
4f, R ₁ = Br, R ₂ =H, R ₃ = Br, R ₄ =H	5,01	188
4g, R ₁ = Br, R ₂ =H, R ₃ = O-Me, R ₄ =H	4,18	189

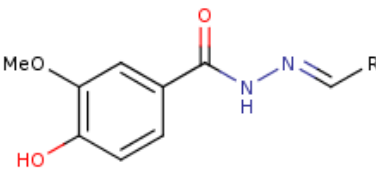
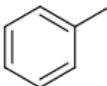
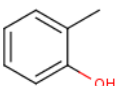
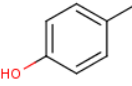
Moléculas bmcl25202010 – Artigo (LI et al., 2010)

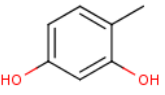
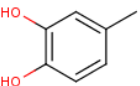
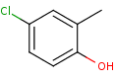
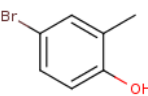
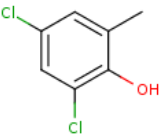
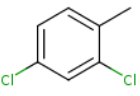
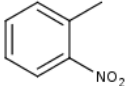
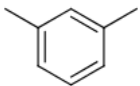
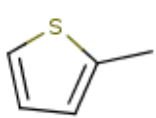
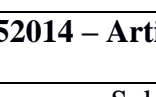
Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
	16, R ₁ = OH, R ₂ =OH, R ₃ = H, R ₄ =F, R ₅ =OH	4,20	190
	17, R ₁ = OH, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =Cl, R ₅ =Me	4,82	191
	18, R ₁ = OH, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =Cl, R ₅ =Br	5,04	192
	19, R ₁ = OH, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =Cl, R ₅ =Cl	5,74	193
	20, R ₁ = OH, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =Cl, R ₅ =NO ₂	5,06	194
	21, R ₁ = OH, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =Cl, R ₅ =OH	4,69	195
	22, R ₁ = OH, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =F, R ₅ =Me	4,45	196
	23, R ₁ = OH, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =F, R ₅ =Br	5,08	197
	24, R ₁ = OH, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =F, R ₅ =Cl	5,41	198
	25, R ₁ = OH, R ₂ =H, R ₃ = H, R ₄ =F, R ₅ =NO ₂	4,54	199

Moléculas cpb622014 – Artigo (SONG et al., 2014)

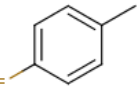
Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
 A	a3, R ₁ = H, R ₂ =H	4,07	200
	a9, R ₁ = H, R ₂ =NO ₂	5,05	201
 B	b4, R ₁ = F, R ₂ =H	4,00	202
	b6, R ₁ = NO ₂ , R ₂ =H	5,46	203
	b7, R ₁ = H, R ₂ =Br	4,95	204
	b8, R ₁ = H, R ₂ =OCH ₃	4,23	205
	b9, R ₁ = H, R ₂ =NO ₂	5,03	206
 C	c6, R ₁ =NO ₂ , R ₂ =H	4,83	207
	c7, R ₁ = H, R ₂ =Br	4,83	208
	c8, R ₁ = H, R ₂ =OCH ₃	5,18	209

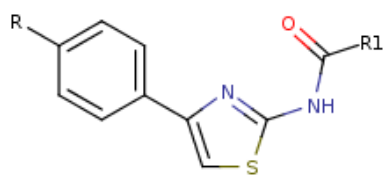
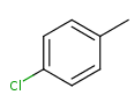
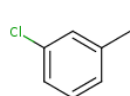
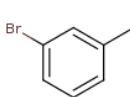
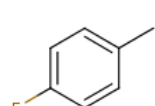
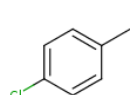
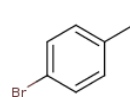
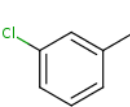
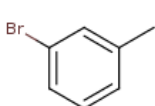
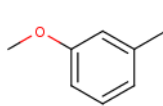
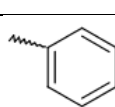
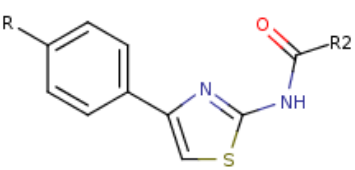
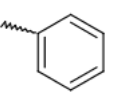
Moléculas ejmc572012 – Artigo (WANG et al., 2012)

Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
	e01- 	4,39	210
	e02- 	4,86	211
	e03- 	4,63	212

e01-e30		4,95	213
e04-		4,62	214
e05-		4,83	215
e07-		5,68	216
e08-		4,00	217
e09-		4,00	218
e01-e30		4,54	219
e16-		4,00	220
e21-		4,39	221
e23-			
e30-			

Moléculas ejmc752014 – Artigo (LI et al., 2014)

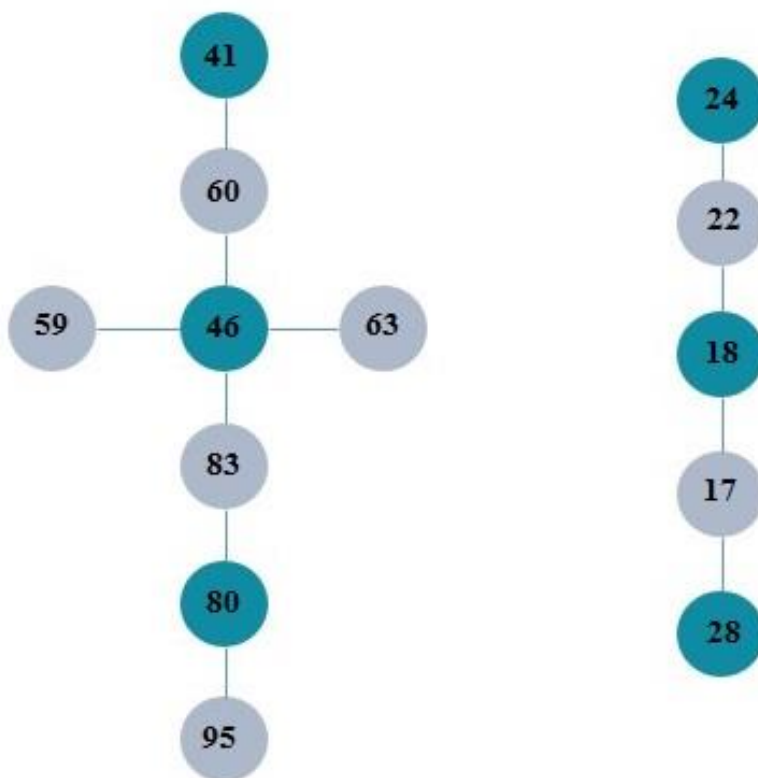
Núcleo base	Substituintes	pIC ₅₀	ID
		4,42	222
4b, R1			

 <p>4b-4h; 5b-5h</p> <p>R4= H</p> <p>R5=Br</p>	4c, R1		4,38	223
	4e, R1		4,91	224
	4f, R1		4,57	225
	5b, R1		4,53	226
	5c, R1		4,46	227
	5d, R1		4,32	228
	5e, R1		5,03	229
	5f, R1		5,24	230
	5g, R1		5,18	231
	4i, R1		4,00	232
 <p>4i-5i</p> <p>R4= H</p> <p>R5=Br</p>	5i, R1		4,00	233

5.2 – Activity Cliff – Similaridade 2D

A partir da metodologia aplicada a similaridade 2D, identificaram-se dois grupos de *activity cliffs*, descritos conforme a figura 15. Nesta figura, temos o Grupo I formado pelas moléculas 24, 22, 18, 17 e 28. O grupo II é um *activity cliff* misto, possui formato de estrela centrado na molécula 46 e em linha entre as moléculas 41 até a molécula 95. Em todos os casos as moléculas em verde apresentam maior valor de pIC₅₀.

Figura 15 – Activity Cliff a partir da similaridade 2D

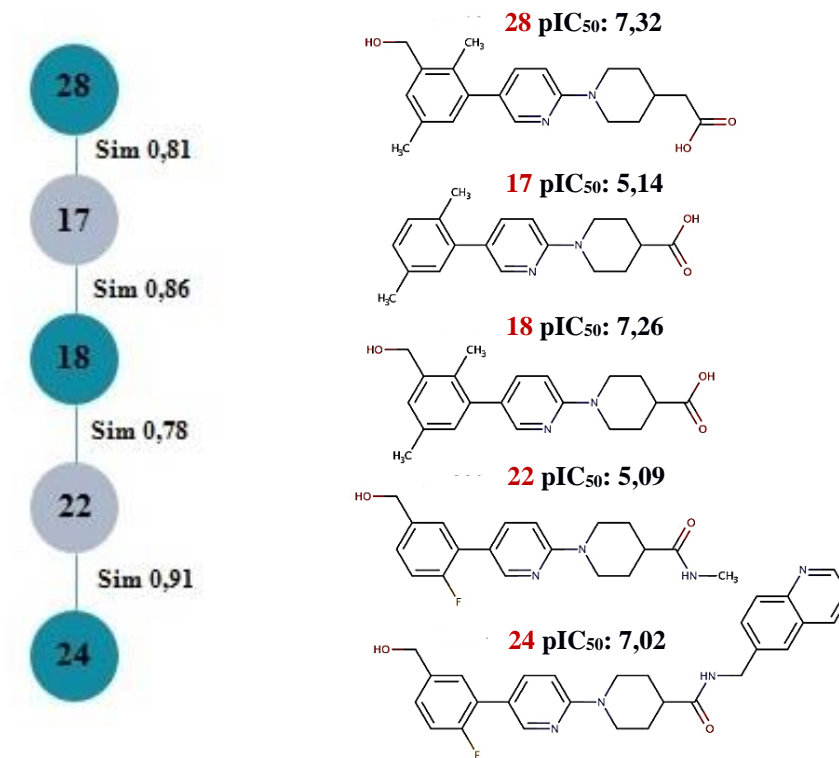


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3 – Activity Cliff 2D entre moléculas com estrutura cristalográfica

Na figura 16, observa-se o grupo I. Neste grupo cada molécula forma um AC com a molécula imediatamente ligada. As moléculas desta figura estão descritas através do seu código de identificação e o número entre as arestas representa a similaridade de Tanimoto (Tc) entre elas.

Figura 16– Activity Cliff em Linha



Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisando o este grupo percebe-se que a molécula 17 apresenta, aproximadamente, 80% de similaridade estrutural (Tc) com as moléculas conectadas a esta, e ao mesmo tempo uma diferença de duas ordens de grandeza na atividade biológica. Esta diferença na atividade deve estar ligada a ausência do hidroximetil na molécula supracitada.

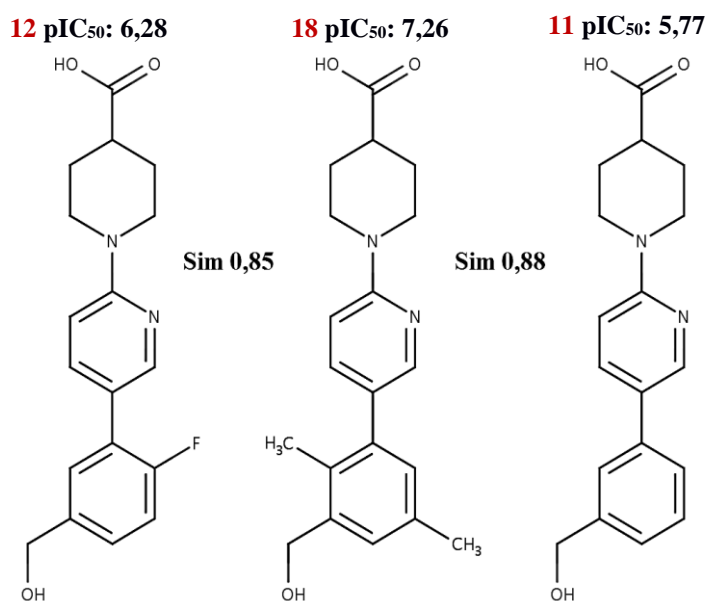
Ainda no grupo I as moléculas 18, 22 e 24 possuem o substituinte hidroximetil na posição meta. Entretanto as moléculas 22 e 24 têm como substituinte o flúor e a molécula 18 possui dois substituintes metil, um na posição meta e outro na posição orto. Além disto, o ácido carboxílico, presente nas moléculas 28, 17 e 18, é substituído por uma amida na molécula 22 e uma amida ligada a quinolina na molécula 24.

Nesta configuração, as moléculas 18 e 24 possuem proximidade em seu valor de pIC_{50} , enquanto a molécula 22 possui grande discrepância em comparação as outras duas. Considerando que as moléculas em tela possuem duas variáveis a serem analisadas recorreu-se ao banco de dados

por moléculas que pudessem isolar as variáveis e assim determinar a contribuição de cada região em separado.

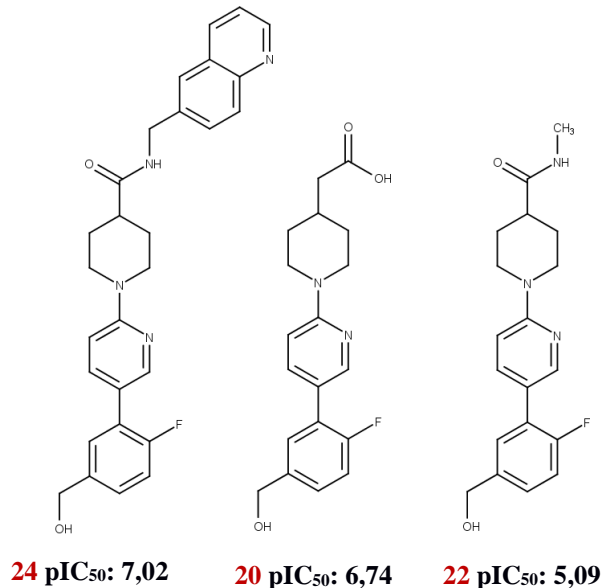
A figura 17 apresenta um conjunto de moléculas que entre si não configuram a formação de um *activity cliff*, dentre os critérios escolhidos. Porém, a análise de sua estrutura atividade poderá elucidar a o questionamento proveniente dos *activity cliff*. As três moléculas possuem em comum o substituinte ácido carboxílico e o substituinte hidroximetil. Ao compara-las percebe-se que: os substituintes metil na posição orto e meta promoveram o maior ganho de atividade, quando comparado á molécula 12 com flúor, e com a molécula 11 sem os substituintes.

Figura 17 - Interações de moléculas para grupo I – parte1



Fonte: Elaborada pelo autor.

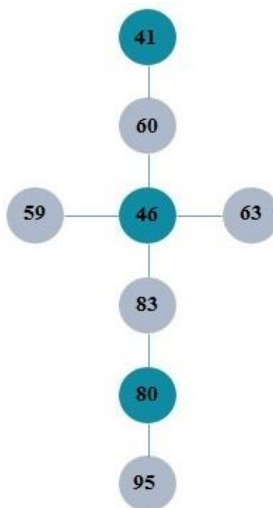
Na figura 18, de forma análoga a figura 17, as moléculas demonstradas não caracterizaram-se como *activities cliffs*. As moléculas 20, 22 e 24 (figura 18) possuem o flúor e o hidroximetil como substituintes do anel benzeno. Por outro lado, demonstra-se que a N-quinolina-metilacetamida provou-se o substituinte com melhor ganho atividade, seguido pelo ácido aceto carboxílico sendo menos ativo a metilacetamida.

Figura 18- Interações Grupo I - Parte II

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 – Activity Cliff similaridade 2D grupo II

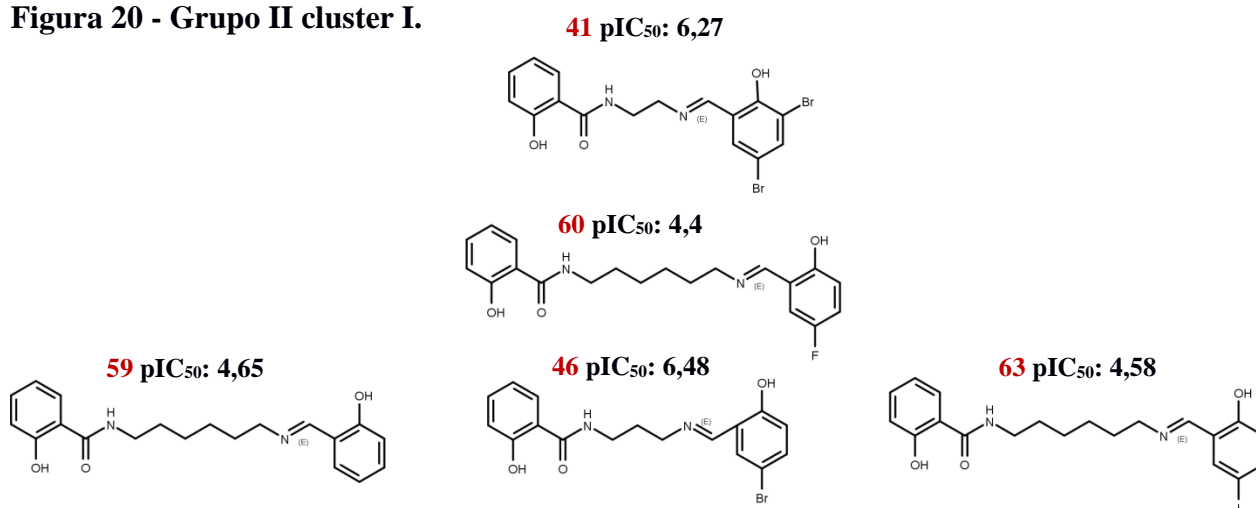
As moléculas da figura 19 formam um AC misto entre linha e estrela, sendo a linha principal entre as moléculas 41 e 95, e o AC em estrela tem como molécula central a 46. Quando diante de um AC com tantas moléculas, a melhor alternativa é dividi-las em grupos menores, para diminuir a variação entre as mesmas.

Figura 19- Grupo II - Grupo misto entre linha e em estrela

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dividiram-se as moléculas do AC demonstrado na figura 19, em dois *clusters*. O primeiro contém as moléculas 41, 60, 46, 59 e 63, conforme descrito na figura 20. A partir desta figura infere-se que o aumento do tamanho da cadeia alifática que interliga os grupos salicilamida e o 2-(iminometil) fenol, é lesiva a atividade biológica. Haja vista que as moléculas menos potentes do *activity cliff* transparecera tal característica. As moléculas 41 e 46 possuem uma cadeia alifática de dois e três carbonos, respectivamente, enquanto que as demais moléculas deste AC possuem seis.

Figura 20 - Grupo II cluster I.



Fonte: Elaborada pelo autor.

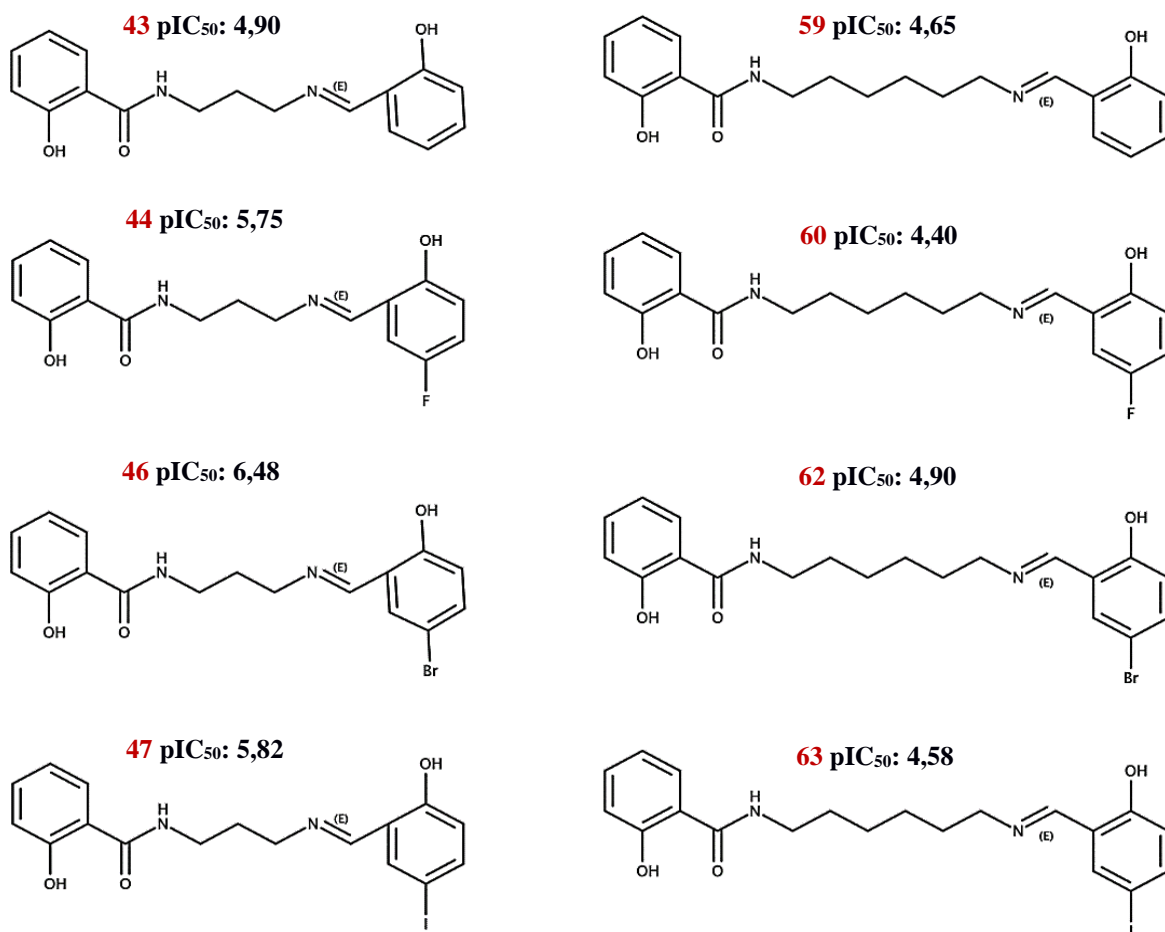
Outro ponto de comparação é o substituinte do grupo 2-(iminometil) fenol. Neste ponto, existiu pouca diferença entre as moléculas 46 e 41 sendo mais favorável a presença de um bromo na posição para, contra um na posição para e outro na posição meta. Já para as moléculas 59, 60 e 63 o substituinte Iodo provou-se melhor do que o flúor e os dois foram ligeiramente inferiores à molécula 59 a qual não apresentou substituinte.

Considerando que as moléculas que formam *activity cliff* possuem diferenças no tamanho da cadeia alifática e no halogênio que atua como substituinte, construiu-se a figura 21 para tentar avaliar a contribuição de cada substituinte, bem como da cadeia alifática na potência de cada molécula.

Nesta figura (figura 21), o substituinte do grupo 2-(iminometil) fenol é o mesmo entre moléculas da mesma linha enquanto que o tamanho da cadeia alifática é o mesmo dentro das

moléculas de mesma coluna. Isto posto, o resultado corrobora o obtido na AC descrito na figura 20, cadeias alifáticas de seis carbonos apresentam menor atividade que a cadeia de três carbonos, para o mesmo halogênio como substituinte do grupo 2-(iminometil) fenol. Outrossim, o substituinte bromo apresentou melhores resultados de atividade que os demais substituintes para as moléculas de mesmo tamanho da cadeia alifática.

Figura 21–Grupo II Cluster I tamanho da cadeia x substituínte.

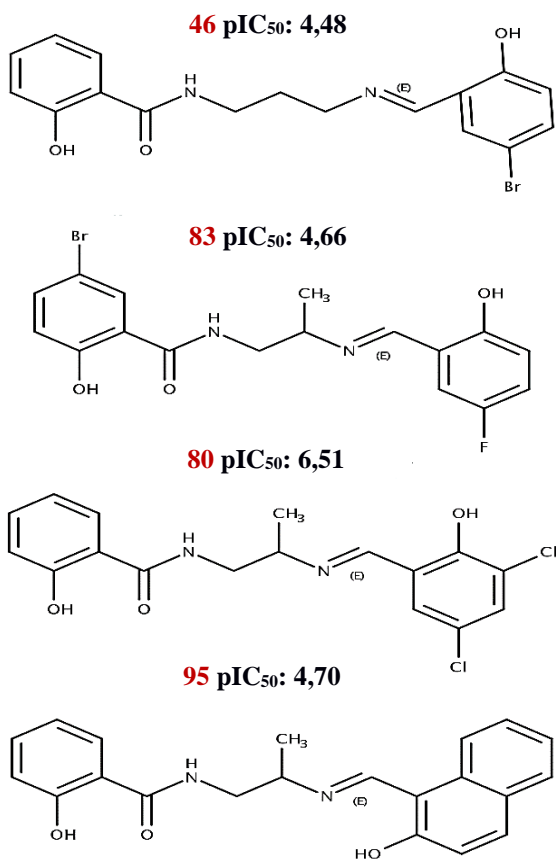


Fonte: Elaborada pelo autor.

O segundo *cluster* é formado pelas moléculas 46, 83, 80 e 95 exemplificadas na figura 22. Ao se comparar as duas últimas moléculas deste AC, temos dois átomos de cloro como substituintes nas posições meta do fenol, da molécula 80. Enquanto que a molécula 95 tem a substituição deste fenol pelo grupo naftaleno-2-ol. Nestas localizações a diferença de atividade entre as duas

moléculas foi de 1,81 ordem de grandeza, sugerindo que as ligações que estes halogênios realizam nesta posição devem favorecer a atividade biológica.

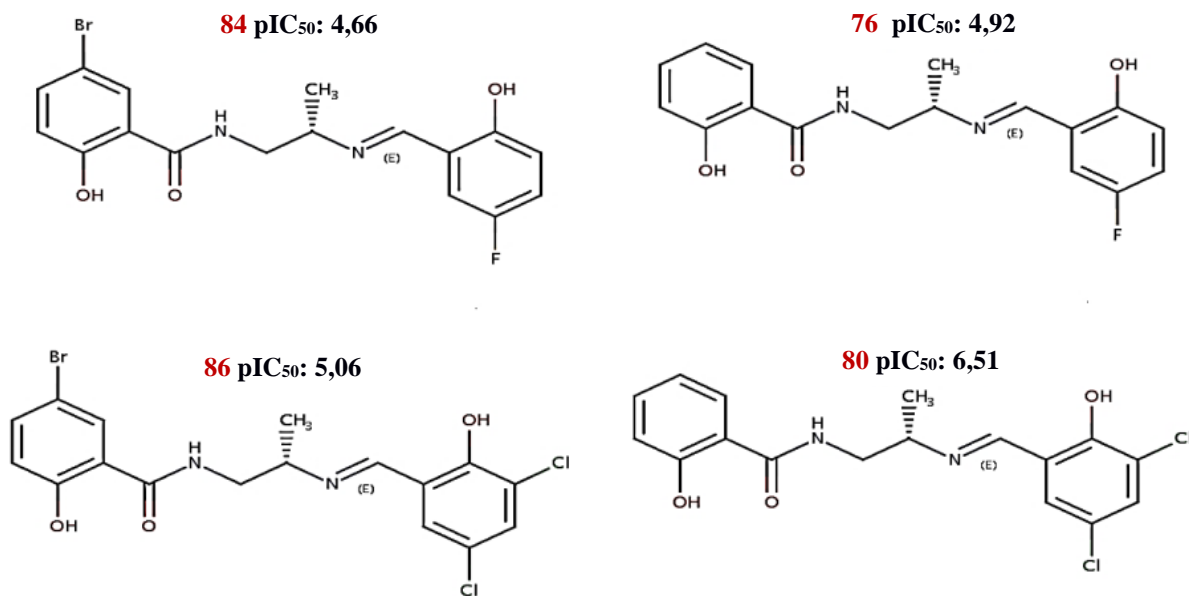
Figura 22 - Grupo 02 moléculas



Fonte: Elaborada pelo autor.

Ainda na figura 22, entre as moléculas 46 e 83, tem-se a substituição do bromo pelo flúor na 2-(iminometil) fenol, esta alteração já foi abordada na figura 21, sendo o bromo mais efetivo na atividade biológica. Apesar do exposto, a presença do bromo agora como substituinte do grupo salicilamida diminui o efeito inibitório. Este efeito pode ser melhor visualizado na comparação entre as moléculas 80 e 83, conforme exemplificado através da figura 23.

Figura 23 - Grupo 02 moléculas bmc182010



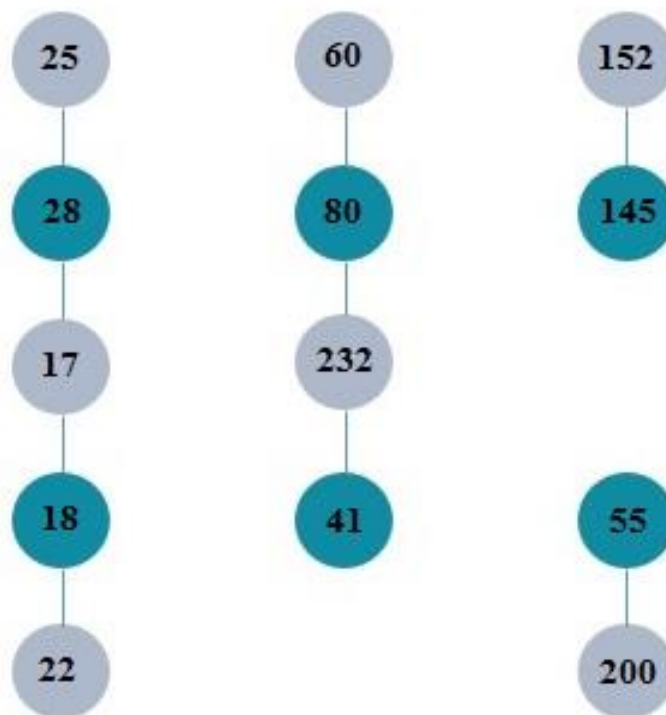
Fonte: Elaborada pelo autor.

Na figura 23, as moléculas dispostas na mesma linha diferenciam-se entre si pela presença ou ausência do bromo como substituinte do grupo salicilamida. Enquanto que as moléculas na mesma coluna alternam os substituintes haleto. Sobre o primeiro caso, a presença do bromo confirma o discutido no parágrafo anterior, promovendo uma diminuição da potência. Em outra via o cloro como substituinte na posição meta promoveu um acréscimo na atividade biológica superior ao promovido pelo Flúor.

5.5 Activity Cliff – Similaridade 3D

Na figura 24 verifica-se a formação de quatro grupos de *activity cliffs*. O primeiro formado pelas moléculas 25, 28, 17, 18 e 22 é denominado grupo I. O grupo II é composto pelas moléculas 60, 80, 232 e 41. Os outros dois contêm duas moléculas cada, sendo o superior (moléculas 145 e 152) chamado de grupo III e o mais abaixo (moléculas 55 e 200) de grupo IV. Esta denominação visa tão somente melhor referenciar cada um destes grupos de *activity cliff*.

Figura 24 – Activity Cliff Similaridade 3D



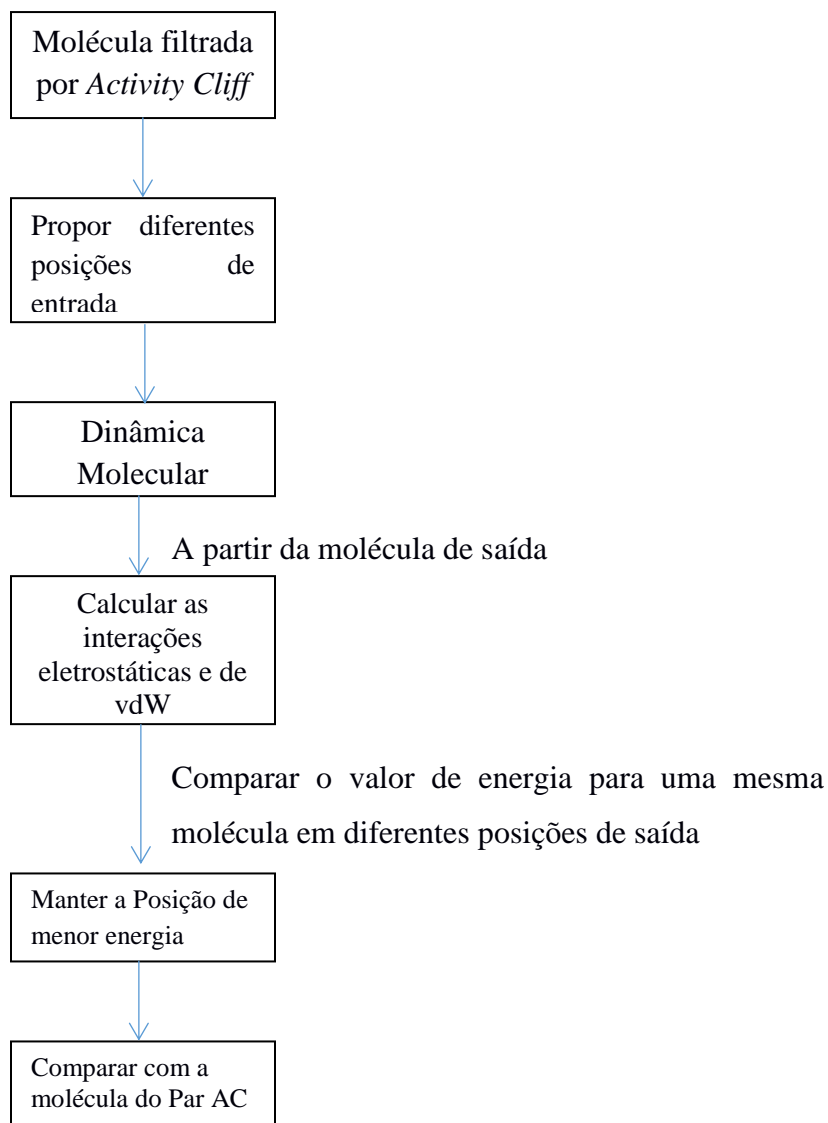
Legenda: Os números representam o ID da molécula. As moléculas em cinza são as de menor potência e as moléculas em verde as de maior potência entre os grupos de *activity cliff*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como a posição de ancoragem destas moléculas é fundamental na percepção das características que formam estes *activity cliffs*, deve inicialmente determinar não só a similaridade entre elas, mas a forma como estas moléculas comportam-se no receptor.

5.5.1 Determinação da posição espacial das moléculas.

Diferentemente da similaridade de Tanimoto, o valor de similaridade descrito pelo *ShaEP* considera não só os átomos que compõem as moléculas como sua posição no espaço. Faz necessário, portanto, avaliar a formação dos *activity cliffs* frente à interação destas moléculas com o sítio ativo.

Figura 25 – Fluxograma AC

Fonte: Elaborada pelo autor.

Conforme demonstrado na figura 25, foram propostas diferentes posições de entrada, e cada uma destas considerava a melhor posição de interação entre subestruturas da molécula com a enzima. Todas estas posições foram submetidas a uma simulação de dinâmica molecular e, ao fim, mensuravam-se as energias (*Short Range*) de Coulomb e Lenard-Jones. As energias obtidas para cada posição, além de características estruturais de cada molécula podem ser verificadas através da Tabela 02.

Tabela 02 – Valores de Energia x Posição.

Molécula	<i>Rotatable Bonds</i>	<i>H- bond accep</i>	<i>H-bond Donors</i>	pIC ₅₀	Posição	$\Delta\text{Coul-}$ <i>SR:Protein- LIG</i>	$\Delta\text{LJ-}$ <i>SR:Protein- LIG</i>	$\Delta\text{Energia}$ <i>Coul+LJ</i>
17	3	3	1	5.14	1	0	0	0
18	4	4	2	7.26	1	0	0	0
22	5	4	2	5.09	1	0	0	0
25	5	6	2	5.26	1	0	0	0
28	5	4	2	7.32	1	0	0	0
041	6	4	3	6.27	1	33.4	11.2	22.2
					2	76.3	-13.2	63.1
					3	0	0	0
055	8	4	3	6.19	1	70.6	-1.2	69.4
					2	68.9	-4.2	64.7
					3	0.0	0.0	0.0
060	10	5	3	4.40	1	18.8	28.7	47.6
					2	0.0	0.0	0.0
					3	-14.4	20.1	5.7
080	6	4	3	6.51	1	46.5	7.3	53.8
					2	0.0	0.0	0.0
145	4	4	2	6.05	1	0.0	0.0	0.0
					2	43.1	-3.4	39.7
					3	21.0	11.4	32.4
152	4	1	0	4.00	1	6.2	1.8	8.0
					2	0.0	0.0	0.0
					3	15.1	22.8	37.8
200	5	4	1	4.07	1	26.1	32.9	59.0
					2	0.0	0.0	0.0
					3	15.0	24.0	38.9
232	4	2	1	4.00	1	0.0	0.0	0.0
					2	8.3	14.7	23.0

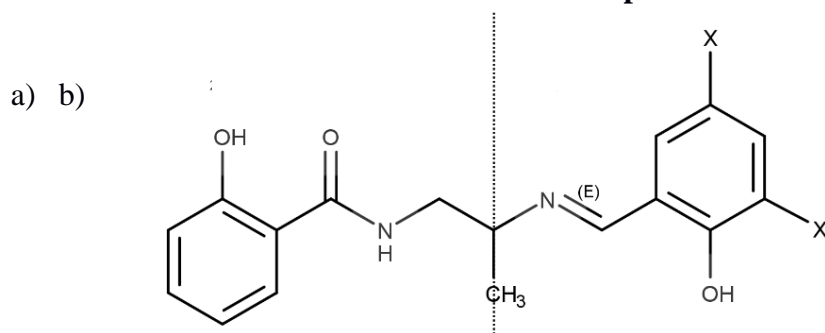
Legenda: Para a molécula de menor energia total atribuiu-se valor 0, sendo as diferentes posições, da mesma molécula, apresentadas a partir da diferença (delta) energia entre as estas.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Outrossim, como o modo de interação para as moléculas 17, 18, 22, 25 e 28 tende a seguir características do ligante utilizado no estudo de dinâmica código PDB 5BNS, só foi proposto um input para cada uma destas moléculas.

As moléculas 41, 55, 60 e 80 possuem em comum o grupo 2-hidroxi-N-benzilamida e o grupo 2-(iminometil) fenol, para este último, as mesmas diferem quanto ao haleto que substitui o anel benzeno Figura 26.

Figura 26 – Subestruturas comuns entre Moléculas de um par AC

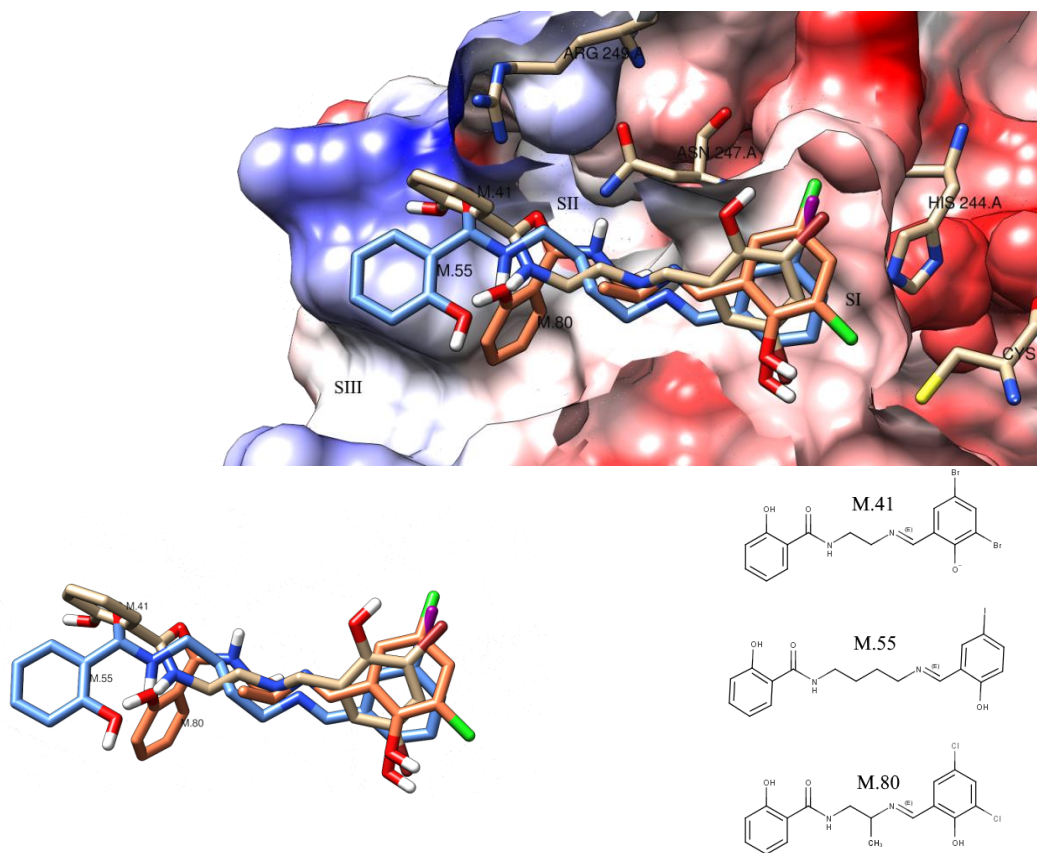


Legenda: A linha Tracejada que divide a molécula em duas metades. A molécula selecionada apresenta apenas a representação dos dois grupos comuns as grupo de moléculas 41, 55, 60 e 80. O lado a) está o grupo 2-hidroxi-N-benzilamida e do lado b) o grupo 2-(iminometil) fenol. O X como substituinte do anel do lado b representa os substituintes haleto que diferem em cada uma das moléculas citadas

Fonte: Elaborada pelo autor.

Considerando a Tabela 02, as posições de menor energia para as moléculas 41, 55 e 80, foram aquelas em que o grupo 2-hidroxi-N-metilbenzamide ancorou a região SII da enzima. Vale salientar ainda que existiu grande congruência na posição do oxigênio da amida, o qual ancorou próximo aos aminoácidos Arg 249 e Asn 247. No entanto, houve divergência quanto à ancoragem da hidroxila na posição orto do anel benzeno: Na molécula 41, a hidroxila manteve-se orientada cima; nas moléculas 55 e 60 o grupo hidroxila orientou-se para baixo. Esta característica não impede que as respectivas moléculas alinhem-se de maneiras distintas da apresentada na figura. Ademais os substituintes haleto alinharam-se em bolsões nas partes superior e inferior da região SI. Todas estas características podem ser vistas na Figura 27.

Figura 27 – Posição de Ancoragem moléculas 55, 80 e 41



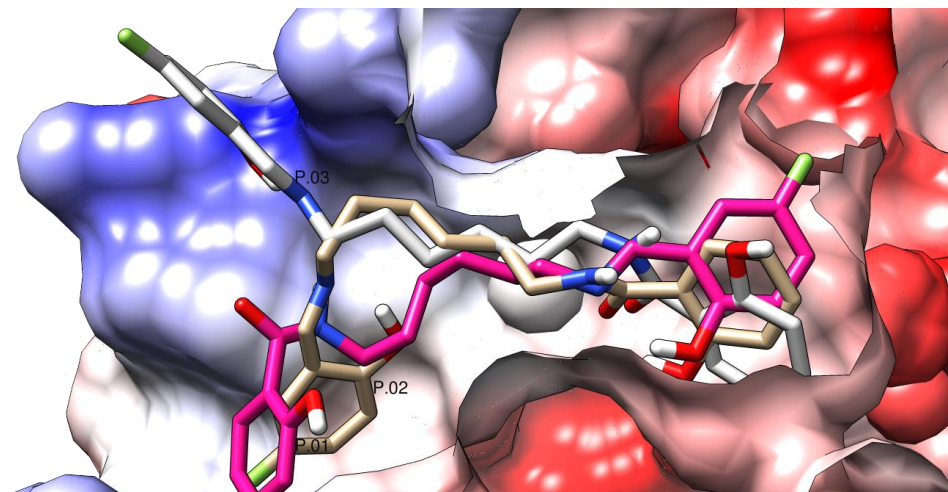
41 – pIC₅₀: 6,27 | 55 – pIC₅₀: 6,19 | 80 – pIC₅₀: 6,57

Fonte: Elaborada pelo autor.

A despeito do ocorrido com as moléculas 41, 55 e 80, para a molécula 60 a posição P.02 (figura 28) ancora os grupos citados na figura 31 de maneira inversa. Ressaltando-se que, diferentemente da demais, a variação em KJ/mol para as energias de Coulomb (Tabela 02) foi bem mais próximo entre as posições, e que a hidroxila do substituinte 2-(iminometil) fenol da molécula 60 ancorou-se de maneira similar as hidroxilas do substituinte 2-hidroxi-N-benzilamida das moléculas 80 e 55.

Durante a dinâmica molecular, buscou-se alinhar a posição de entrada (input) da molécula 60 com os das moléculas 41, 55 e 80 (moléculas com maior valor de pIC₅₀). Porém, devido ao grande número de ligações com capacidade rotacional, aliado ao maior tamanho da cadeia carbônica, obteve-se uma ancoragem diferente para os aludidos grupos.

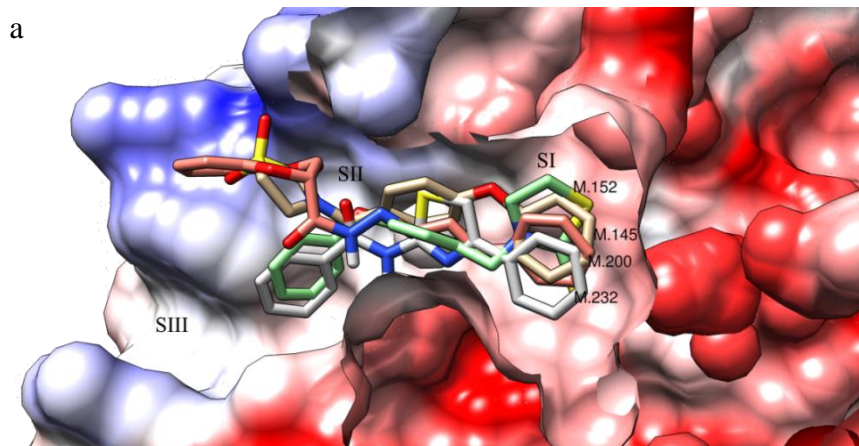
Figura 28 – Posição de Ancoragem molécula 60

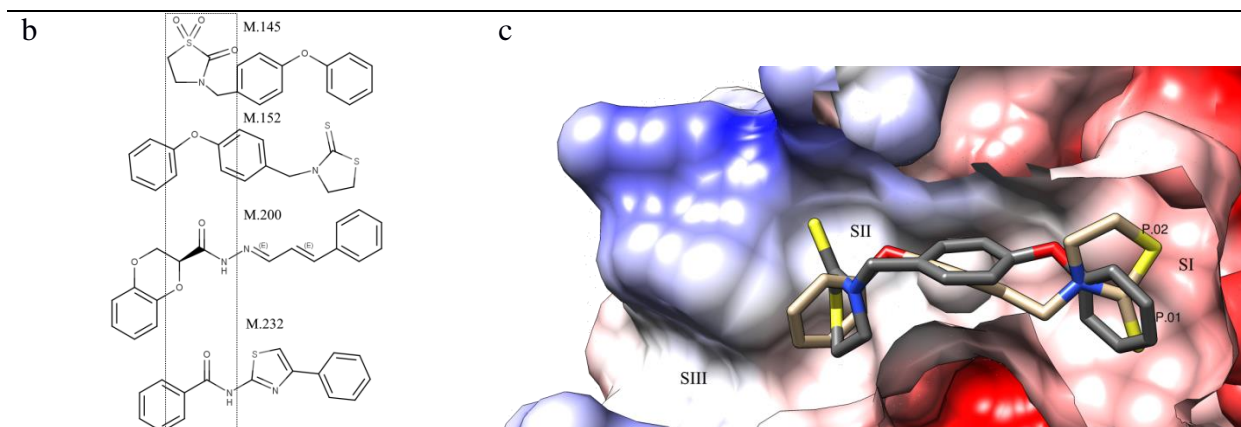


Fonte: Elaborada pelo autor.

Por fim, a posição com menor energia total para as moléculas 145, 152, 200 e 232 foi a que obteve melhor alinhamento de um oxigênio aceptor de ligação de hidrogênio próximo à região SII do sítio ativo (Figura 29 a e b). As moléculas 145 e 152 compartilham o núcleo Éter difenílico, mas diferem quanto à posição de ancoragem do mesmo. Para a molécula 145 o primeiro anel benzeno deste núcleo está ancorado a região SI, contudo para a molécula 152 a posição deste anel é levemente mais favorecida para a região SII. No caso da molécula 152 a diferença energética entre estas duas posições do o éter difenílico (figura 29 c) é bastante diminuta estando na casa dos 8KJ/Mol, o que abre a possibilidade desta molécula assumir duas posições prevalentes no sítio ativo.

Figura 29 - Posição de Ancoragem moléculas 145, 152, 200 e 232





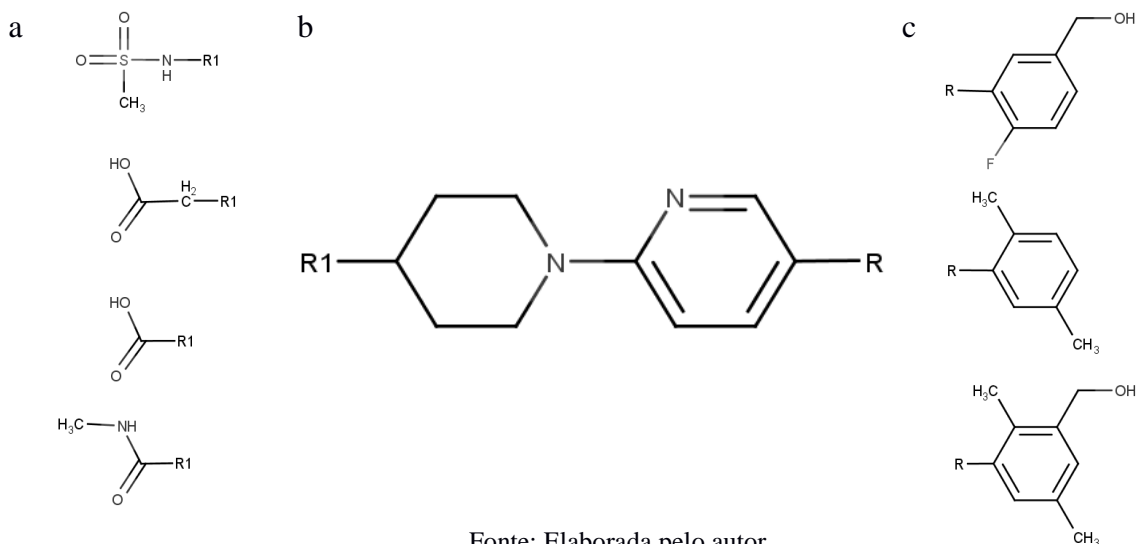
Legenda: a) A superfície do sítio está colorida a partir do potencial de Coulomb e as moléculas estão identificadas conforme o seu código. b) O quadrado tracejado realça os oxigênios que encontram-se próximos a região SII do sítio ativo. c) Posição de ancoragem para as duas posições da molécula 152.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.5.2 Discussão dos Pares AC.

No grupo I, figura 24, as moléculas possuem o mesmo esqueleto (Figura 30 b) e formam entre si um AC em linha. Neste AC os substituintes deste esqueleto estão localizados no anel piperidine no lado esquerdo (Figura 30 a) e no anel piridine no lado direito (Figura 30 c). Dentre as subestruturas apresentadas, a combinação de ácido carboxílico e o ácido acético do lado esquerdo e o (2,4-Dimetilfenil) metanol do lado direito responderam pelos maiores valores de pIC_{50} dentre as moléculas que compõe este AC.

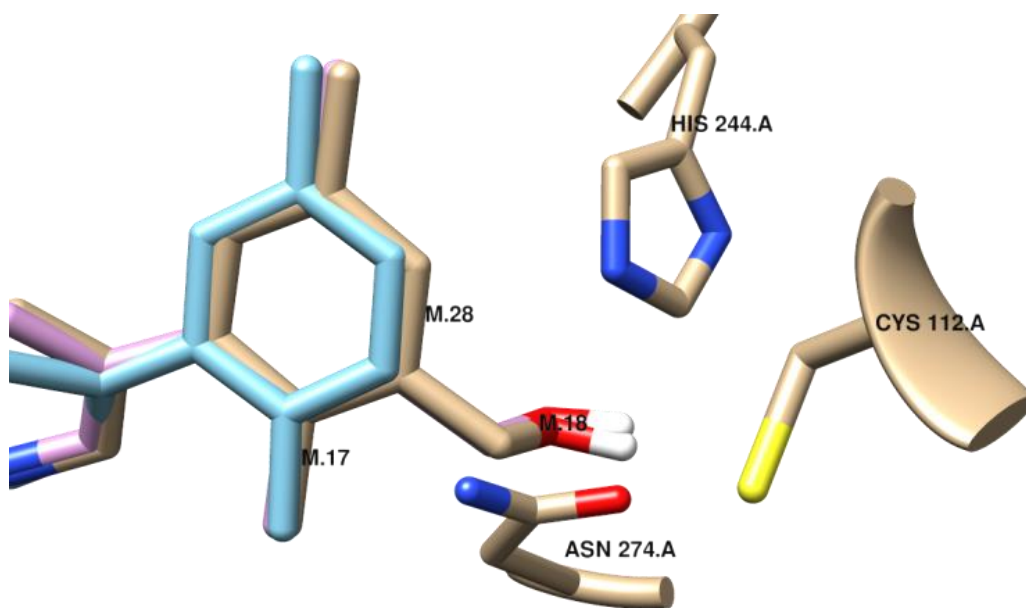
Figura 30 – Semelhanças estruturais Grupo I



Fonte: Elaborada pelo autor.

Avaliando o AC formado entre as moléculas 28, 17 e 18 (Grupo I) a ausência de um grupo doador de ligação de hidrogênio mostrou-se danosa à atividade biológica da molécula 17. Alinhando-se as três moléculas no sítio ativo (figura 31) percebe-se que este doador de ligação de hidrogênio encontra-se na região SI próximo a tríade catalítica (Asn274, Cys112, His244), provavelmente, esta interação respondeu por um ganho de atividade de duas ordens de grandeza, confirmando a importância desta interação, fato este já discutido na similaridade 2D.

Figura 31 – Posição de Ancoragem Grupo I

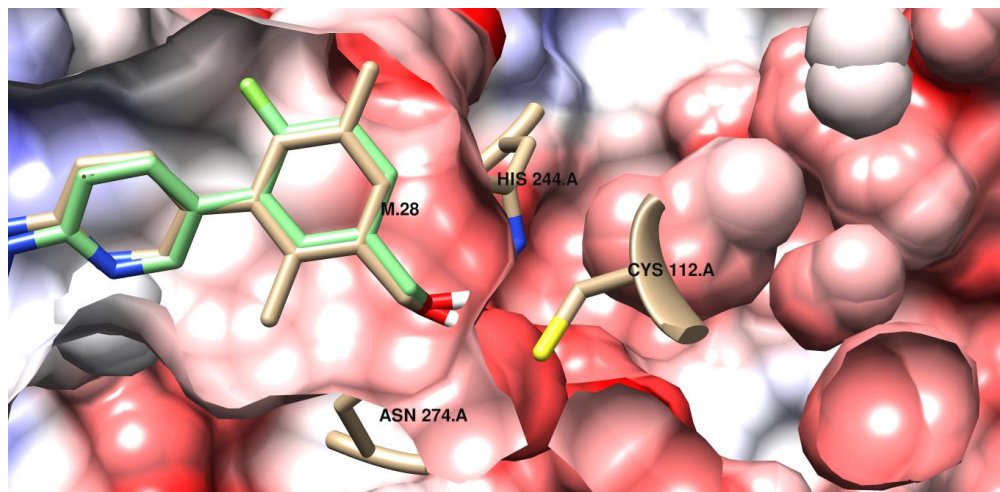


Legenda: As moléculas M28 e M18 conseguem realizar ligações de hidrogênio com a asparagina e com a histidina a partir do substituinte Metil-hidroxila, enquanto que a molécula 17 não o faz pela ausência do referido substituinte.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Na similaridade 2D, figura 17, o (2,4-Dimetilfenil) metanol mostrou-se mais ativo que 3-fluorofenil metanol e este mais ativo que o fenil-metanol. Apesar de todos estes poderem realizar a ligação de hidrogênio, proposta na figura 31, a de se perceber que a natureza das interações promovidas pelo flúor e o dimetil, como substituintes do anel benzeno, são diferentes. Isto posto, existe a possibilidade desta diferença de atividade residir em um efeito estérico ocasionado pelo volume ocupado por estes substituintes no sítio ativo (Figura 32).

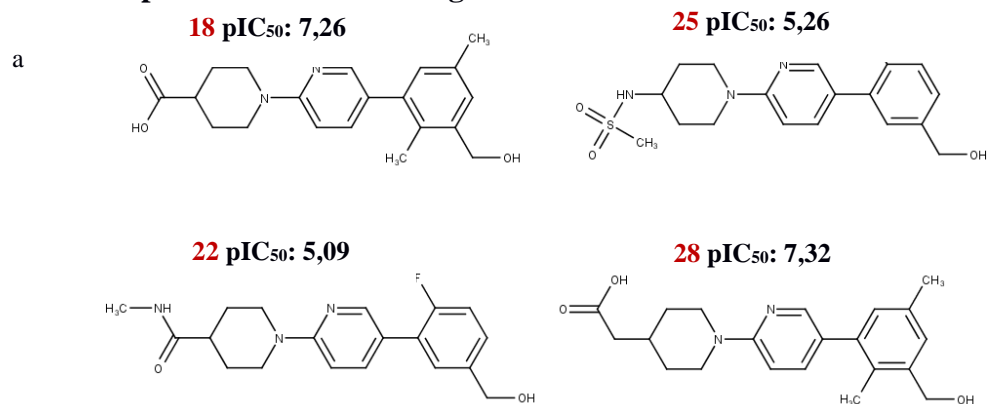
Figura 32– Região SI grupos volumosos



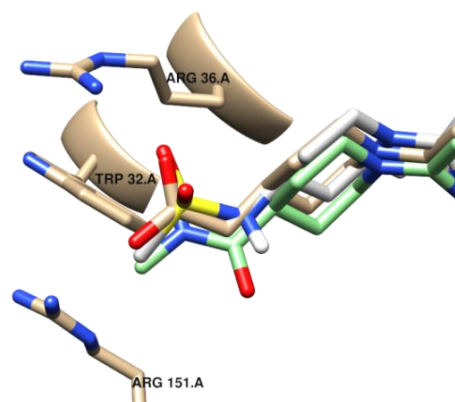
Fonte: Elaborada pelo autor.

Ainda no grupo I, percebem-se os *activity cliffs* formados entre as moléculas 25-28 e 18-22 (figura 33a). Quando na presença de um grupo aceptor de ligação de hidrogênio próximo aos resíduos polares de arginina 151 e arginina 36, na região SIII, houve um ganho de atividade (figura 33b). Vale verificar o discreto incremento de atividade do ácido acético (molécula 18) contra o ácido carboxílico (molécula 28) estando o primeiro mais próximo dos resíduos supracitados. Por outro lado, o grupo metil da N-metilacetamida e da N-metilsulfonamida podem estar limitando a aproximação destas subestruturas dos aminoácidos em tela. Porém, nos estudos de dinâmica conduzidos não houve diferença nas posições dos referidos aminoácidos em relação a estes grupos.

Figura 33 – Grupo I Posição de ancoragem



b

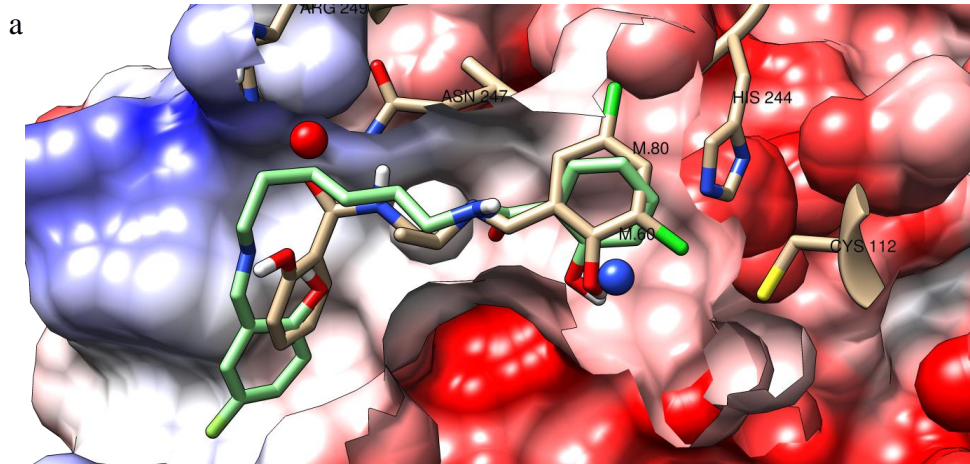


Fonte: Elaborada pelo autor.

No grupo II o primeiro *activity cliff* em linha acontece entre as moléculas 60 e 80, conforme demonstrado na figura 34. Nesta figura estão destacadas com esferas azuis doadores de hidrogênio e com esferas vermelhas aceptores de hidrogênio. Neste *activity cliff*, os grupos doadores de ligação de hidrogênio encontram-se em uma região mais eletronegativa, a região SI, próximos aos resíduos de histidina 244 e cisteína 112 os quais poderiam funcionar como aceptores de hidrogênio nesta posição, porém o doador de ligação de hidrogênio da molécula 80 por contar com moléculas volumosas de cloro restringiria a rotação do anel benzênico estabilizando a posição de interação destas possíveis ligações.

A posição do grupo aceptor de ligação de hidrogênio da molécula 80 encontra-se adjacente aos aminoácidos Arg 249 e Asn247, favorecendo a interação com estes aminoácidos mais positivos. O grande tamanho da molécula 60 e o número de ligações com capacidade rotacional dificulta o mesmo posicionamento deste grupo receptor de ligação de hidrogênio.

Figura 34– Grupo II Posição de Ancoragem

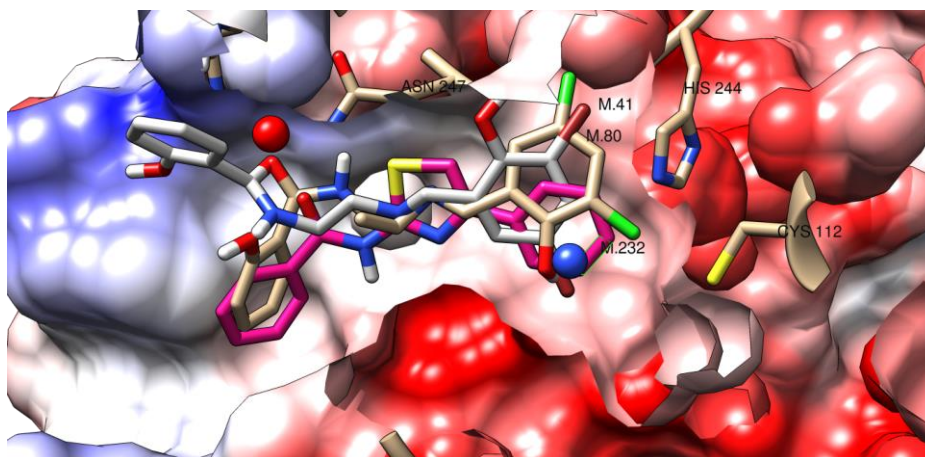


Molécula	Rotable Bonds	H-bond accep	H-bond Donors	Delta Log IC 50	ShaEP
060	10	5	3	2.11	0.905
080	6	4	3		

Fonte: Elaborada pelo autor.

A diferença de atividade entre o próximo *activity cliff*, formado entre as moléculas 80, 232 e 41, deve estar intimamente ligada ao posicionamento ou ausência dos grupos doadores de ligação de hidrogênio no sítio SI. Na figura 35 percebe-se que o oxigênio do grupo amida, da molécula 80, posiciona-se de maneira equivalente ao da molécula 41, e muito próximo ao da molécula 232. Por outro lado, a ausência de um grupo doador de ligação de hidrogênio, (molécula 232) parece ter afetado a atividade desta molécula em duas ordens de grandeza, aproximadamente. Este resultado estaria em linha com ilação proposta ao *activity cliff* formado entre as moléculas 17 e 18.

Figura 35 – Grupo II posição de ancoragem moléculas 80, 232 e 41

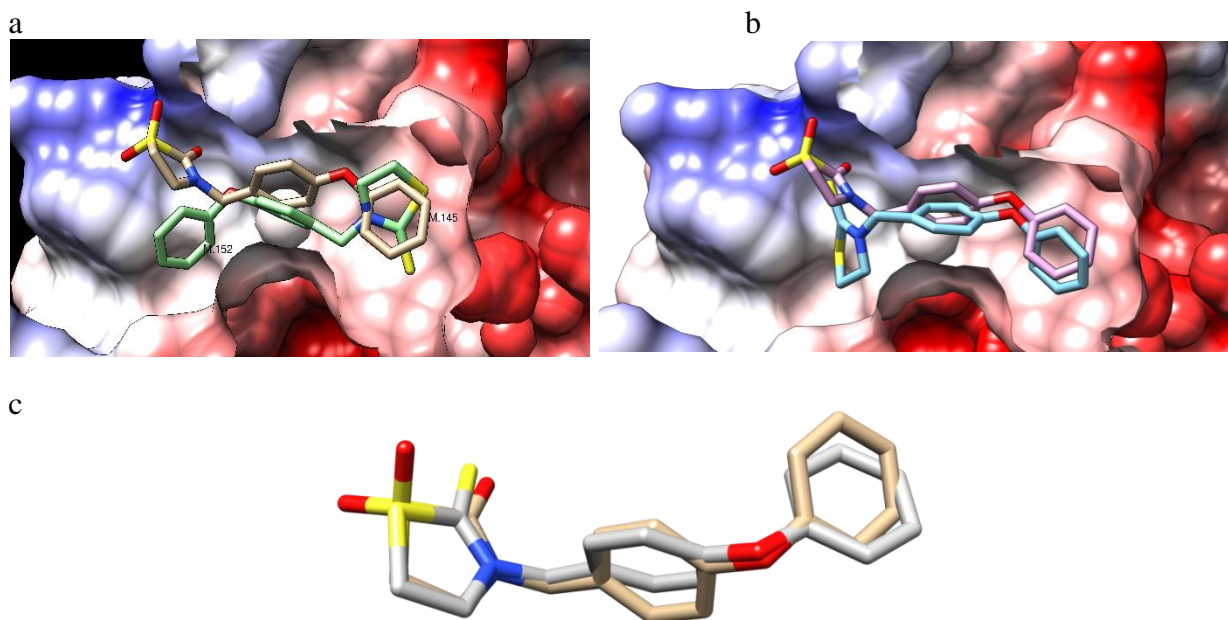


Molécula	Rotable Bonds	H-bond accep	H-bond Donors	ΔpIC_{50}	ShaEP
80	6	4	3	2,51	0,91
232	4	2	1	2,27	0,93
41	6	4	3		

Fonte: Elaborada pelo autor.

O grupo III formado pelas moléculas 145 e 152 foi avaliado a partir de duas posições possíveis para a molécula 152 (Figuras 36a e 36b). As moléculas citadas obtiveram um valor de *ShaEP* de 0.98, mas com uma diferença de 2,05 ordens de grandeza na atividade. Na figura 36c as duas moléculas estão com alinhamento provido pelo software pharmacophore. Este alinhamento (molécula 152) está mais próximo ao posicionamento dado na figura 36b. Neste ponto, o posicionamento dos grupos aceptores de ligação de hidrogênio da molécula 145 (figura 36b) encontram-se próximos á uma região eletropositiva (região SII), e de fato sugere contribuir com a atividade biológica desta molécula.

Figura 36 – Grupo III – Posição de ancoragem

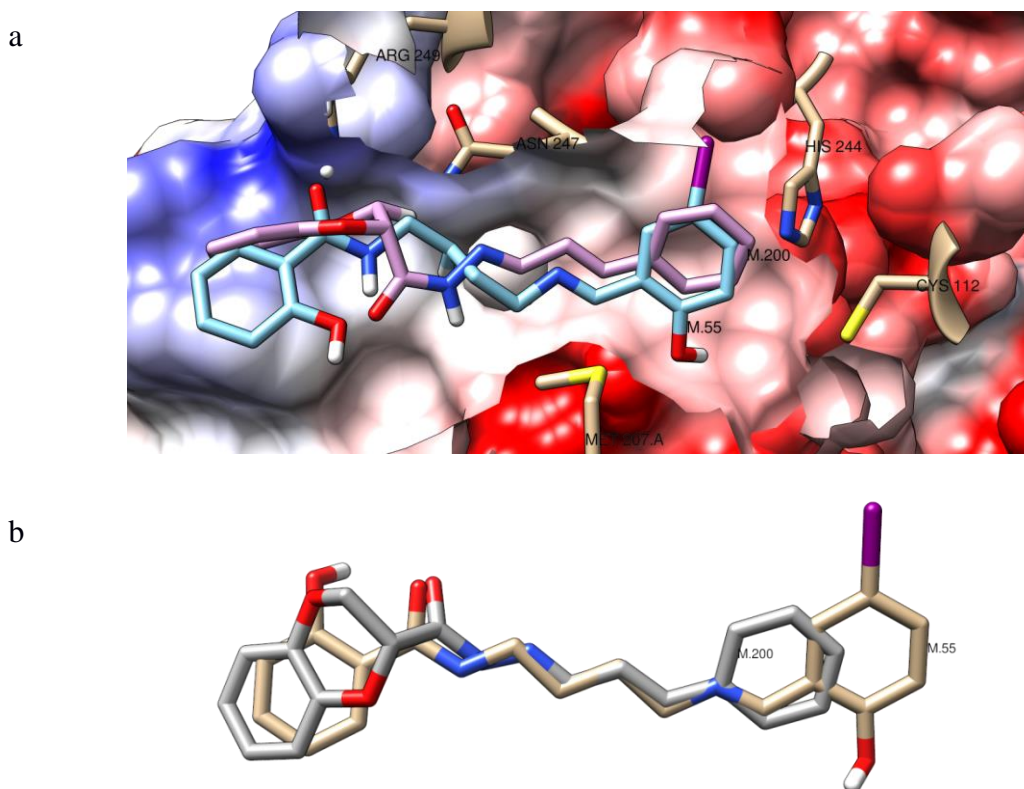


Molécula	Rotable Bonds	H-bond accep	H-bond Donors	ΔpIC_{50}	<i>ShaEP</i>
145	4	4	2	2.05	0.98
152	4	1	0		

Fonte: Elaborada pelo autor.

O grupo IV é formado pelas moléculas 55 e 200, sendo a molécula 55 a de maior valor de pIC_{50} . As duas moléculas ancoram-se entre as regiões SI e SII, posicionando receptores de ligação de hidrogênio na região SII de forma similar a molécula 60 e 80. Porém, de forma análoga ao grupo I, a ausência de um grupo doador de ligação de hidrogênio, neste caso a hidroxila, no sítio I (figura 37a) parece responder pela diferença de atividade entre as duas moléculas.

Figura 37 - Grupo IV – Posição de Ancoragem



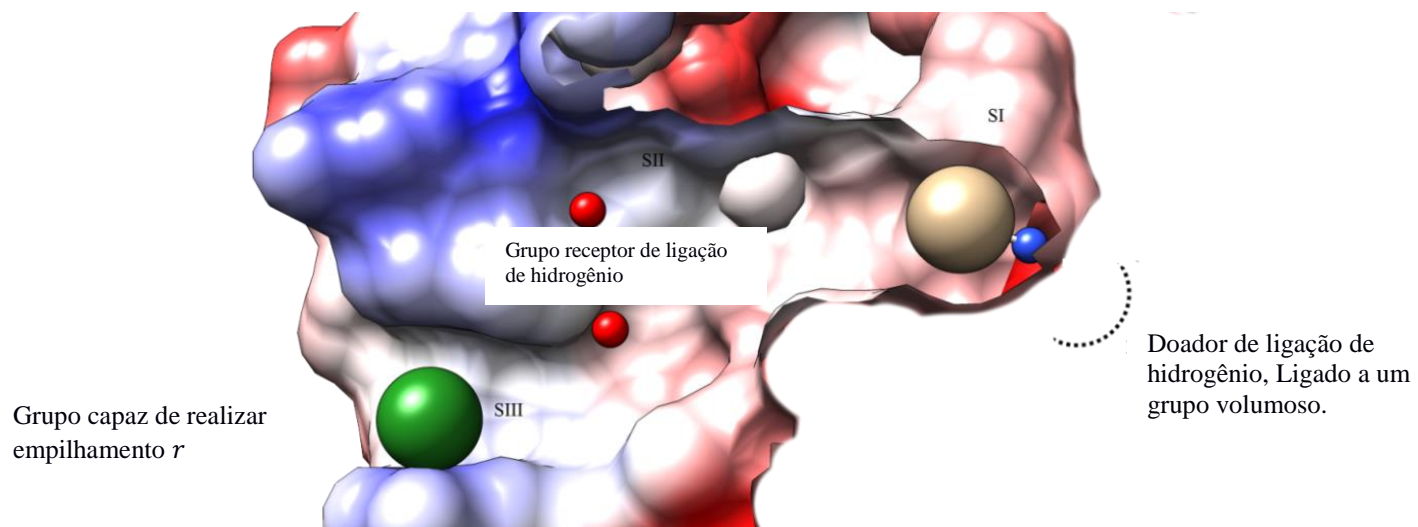
Molécula	<i>Rotable Bonds</i>	<i>H-bond accep</i>	<i>H-bond Donors</i>	$\Delta\text{Log IC } 50$	<i>ShaEP</i>
55	8	4	3	2.12	0.93
200	5	4	1		

Legenda: a As moléculas M28 e M18 conseguem realizar ligações de hidrogênio com a asparagina e com a histidina a partir do substituinte Metil-hidroxila, enquanto que a molécula 17 não o faz pela ausência do referido substituinte.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir de todas as características relatadas até então construiu-se a figura 38. Nesta figura estão destacados os principais pontos do sítio ativo, bem como, a natureza dos grupos farmacofóricos capazes de prover a melhor resposta a novos análogos.

Figura 38- Estrutura da molécula Ideal



Fonte: Elaborada pelo autor.

6.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os *activity cliffs* formados pelas moléculas 17, 18 e 28 demonstram a importância do grupo metil-hidroxila na região SI do sítio ativo, próxima aos resíduos de histidina 244, cisteína 112 e asparagina 274. Associado a isto, o tempo de exposição gerado por grupos volumosos aumentaria a eficiência do referido grupo, conforme visualizado entre as moléculas 80, 232 e 41 e entre as moléculas 11, 12 e 18. Outra característica é a presença de grupos receptores de ligação de hidrogênio, próximo aos resíduos de arginina 249, asparagina 247, como também a arginina 36 e arginina 151 nas regiões SII e SIII respectivamente. Outrossim, O aumento do tamanho da cadeia alifática dos compostos 59, 60 e 63 diminui a atividade destas moléculas. Para a molécula 60 percebeu-se que este aumento da cadeia alifática alterou a posição de ancoragem de algumas de suas subestruturas quando comparada a molécula 80. Por fim, a região SIII configura-se como um bolsão importante a ser explorado, gerando um ganho de atividade através de grupos capazes de interagir nesta região através de empilhamento Pi de maneira similar ao substrato natural.

REFERÊNCIAS

- ALHAMADSHEH, Mamoun M. et al. Synthesis and biological evaluation of thiazolidine-2-one 1,1-dioxide as inhibitors of Escherichia coli β -ketoacyl-ACP-synthase III (FabH). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.879-883, fev. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.11.067>.
- ANDRADE, Carolina Horta et al. Abordagem racional no planejamento de novos tuberculostáticos: inibidores da InhA, enoil-ACP redutase do M. tuberculosis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.167-179, jun. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-93322008000200002>.
- BAJORATH, Jürgen. Representation and identification of activity cliffs. **Expert Opinion On Drug Discovery**, [s.l.], v. 12, n. 9, p.879-883, 12 jul. 2017. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17460441.2017.1353494>
- BASTIAN, M.; HEYMANN, S.; JACOMY, M. Gephi: An Open Source Software for Exploring and Manipulating Networks. **Third International AAAI Conference on Weblogs and Social Media**, p. 361–362, 2009.
- CHENG, Kui et al. Synthesis, antibacterial activities and molecular docking studies of peptide and Schiff bases as targeted antibiotics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 17, n. 23, p.7861-7871, dez. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.10.037>.
- CHENG, Kui et al. Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of PSB as targeted antibiotics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 18, n. 7, p.2447-2455, abr. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2010.02.052>.
- CHENG, Kui; XUE, Jia-yu; ZHU, Hai-liang. Design, synthesis and antibacterial activity studies of thiazole derivatives as potent ecKAS III inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 23, n. 14, p.4235-4238, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.05.006>.
- DAINES, Robert A. et al. First X-ray Cocystal Structure of a Bacterial FabH Condensing Enzyme and a Small Molecule Inhibitor Achieved Using Rational Design and Homology Modeling. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.5-8, jan. 2003. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm025571b>.
- DEL FIOL, Fernando de Sá et al . Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 43, n. 1, p. 68-72, Feb. 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822010000100015>.
- DIMOVA, Dilyana; BAJORATH, Jürgen. Extraction of SAR information from activity cliff

clusters via matching molecular series. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 87, p.454-460, nov. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.09.087>.

GUHA, Rajarshi; VAN DRIE, John H.. Structure–Activity Landscape Index: Identifying and Quantifying Activity Cliffs. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, [s.l.], v. 48, n. 3, p.646-658, mar. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ci7004093>.

HOLLIDAY, John D.; RANADE, Sonia S.; WILLETT, Peter. A Fast Algorithm For Selecting Sets Of Dissimilar Molecules From Large Chemical Databases. **Quantitative Structure-activity Relationships**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.501-506, 1995. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/qsar.19950140602>.

KENNY, Peter W.; SADOWSKI, Jens. Structure Modification in Chemical Databases. **Methods And Principles In Medicinal Chemistry**, [s.l.], p.271-285, 19 maio 2005. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://dx.doi.org/10.1002/3527603743.ch11>.

KHABBAZ, Rima F et al. Challenges of infectious diseases in the USA. **The Lancet**, [s.l.], v. 384, n. 9937, p.53-63, jul. 2014. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)60890-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(14)60890-4).

KIM, Pilho et al. Structure–Activity Relationships at the 5-Position of Thiolactomycin: An Intact (5R)-Isoprene Unit Is Required for Activity against the Condensing Enzymes from *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli*. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 49, n. 1, p.159-171, jan. 2006. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm050825p>.

KORB, Oliver et al. PharmACOPhore: Multiple Flexible Ligand Alignment Based on Ant Colony Optimization. **Journal Of Chemical Information And Modeling**, [s.l.], v. 50, n. 9, p.1669-1681, 27 set. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ci1000218>.

LI, Huan-qiu et al. Synthesis of C(7) modified chrysin derivatives designing to inhibit β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) as antibiotics. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 17, n. 17, p.6264-6269, 1 set. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.07.046>.

LI, Huan-qiu et al. Design and synthesis of novel deoxybenzoin derivatives as FabH inhibitors and anti-inflammatory agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.2025-2028, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.01.032>.

LI, Jing-ran et al. Design and synthesis of thiazole derivatives as potent FabH inhibitors with antibacterial activity. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 75, p.438-447, mar.

2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.020>.

LI, Yao et al. Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1,3,4-oxadiazole scaffold as FabH inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 20, n. 14, p.4316-4322, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.05.050>.

LI, Yao et al. Design, synthesis and antimicrobial activities evaluation of Schiff base derived from secnidazole derivatives as potential FabH inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 21, n. 11, p.3120-3126, jun. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.023>.

LU, Ying-jie; ZHANG, Yong-mei; ROCK, Charles O. Product diversity and regulation of type II fatty acid synthases. **Biochemistry And Cell Biology**, [s.l.], v. 82, n. 1, p.145-155, fev. 2004. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/o03-076>

LV, Peng-cheng et al. Design, synthesis, and structure–activity relationships of pyrazole derivatives as potential FabH inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 20, n. 15, p.4657-4660, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.105>.

MAGGIORA, Gerald et al. Molecular Similarity in Medicinal Chemistry. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 57, n. 8, p.3186-3204, 11 nov. 2013. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm401411z>.

MARTIN, Yvonne C.; KOFRON, James L.; TRAPHAGEN, Linda M.. Do Structurally Similar Molecules Have Similar Biological Activity? **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 45, n. 19, p.4350-4358, set. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm020155c>.

MCKINNEY, David C. et al. Antibacterial FabH Inhibitors with Mode of Action Validated in Haemophilus influenzae by in Vitro Resistance Mutation Mapping. **Acs Infectious Diseases**, [s.l.], v. 2, n. 7, p.456-464, 9 maio 2016. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00053>.

MOTA, Rinaldo Aparecido et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal Of Veterinary Research And Animal Science**, [s.l.], v. 42, n. 6, p.465-470, 1 dez. 2005. Universidade de Sao Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2005.26406>.

O'BOYLE, Noel M et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal Of Cheminformatics**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.33-47, 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1758-2946-3-33>.

O'NEILL, J. Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations, 2014. v. 4, n. December, 2014.

PELTASON, Lisa; BAJORATH, Jürgen. SAR Index: Quantifying the Nature of Structure–Activity Relationships. **Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 50, n. 23, p.5571-5578, nov. 2007. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jm0705713>.

PEREZ, Miguel; CASTILLO, Yunierkis. Bacterial β -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III (FabH): An Attractive Target for the Design of New Broad-Spectrum Antimicrobial Agents. **Mini-reviews In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.36-45, 1 jan. 2008. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138955708783331559>.

PÉREZ-VILLANUEVA, Jaime et al. Activity cliffs and activity cliff generators based on chemotype-related activity landscapes. **Molecular Diversity**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.1021-1035, 7 jul. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11030-015-9609-z>.

PESSOA ROCHA, D. et al. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 111–118, 2011.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–12, out. 2004.

POWER, E. Impact of antibiotic restrictions: the pharmaceutical perspective. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 12 Suppl 5, ago. 2006.

QIU, X. et al. **RCSB PDB - 1HNJ_ CRYSTAL STRUCTURE OF BETA-KETOACYL-ACP SYNTHASE III + MALONYL-COA**. Disponível em: <<https://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1hnj>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

QIU, X. et al. Refined structures of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. **Journal of molecular biology**, v. 307, n. 1, p. 341–356, 2001.

RICHARDSON, L. A. Understanding and overcoming antibiotic resistance. **PLoS Biology**, v. 15, n. 8, p. 1–5, 2017.

ROCA, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbes and New Infections**, v. 6, n. 0, p. 22–29, jul. 2015.

SONG, X. et al. Synthesis and Antibacterial Activity of Cinnamaldehyde Acylhydrazone with a

1,4-Benzodioxan Fragment as a Novel Class of Potent β -Ketoacyl-Acyl Carrier Protein Synthase III (FabH) Inhibitor. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 62, n. 11, p. 1110–1118, 2014.

STUMPFE, D.; BAJORATH, J. Exploring activity cliffs in medicinal chemistry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2932–2942, 2012.

VAINIO, M. J.; PURANEN, J. S.; JOHNSON, M. S. ShaEP : Molecular Overlay Based on Shape and Electrostatic Potential ShaEP : Molecular Overlay Based on Shape and Electrostatic Potential. **Methods**, v. 49, n. February, p. 492–502, 2009.

VAN DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005.

VINCENT ZOETE, MICHEL A. CUENDET, AURÉLIEN GROSDIDIER, O. M. SwissParam: A Fast Force Field Generation Tool for Small Organic Molecules. **Journal of computational chemistry**, v. 32, n. 11, p. 2359–2368, 2011.

WANG, X. L. et al. Design, synthesis and antibacterial activities of vanillic acylhydrazone derivatives as potential β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 373–382, 2012.

WHITE, S. W. et al. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. **Annual review of biochemistry**, v. 74, 2005a.

WHITE, S. W. et al. the Structural Biology of Type II Fatty Acid Biosynthesis. **[Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev.Biochem.74.082803.133524](http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133524)**, v. 74, p. 791–831, 2005b.

WHO. Antimicrobial resistance. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 3, p. 383–94, 2014a.

WHO. **ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance**. [s.l: s.n.].

WILLETT, P. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. **Drug Discovery Today**, v. 11, n. 23-24, p. 1046–1053, 2006.

WILLETT, P.; BARNARD, J. M.; DOWNS, G. M. Chemical Similarity Searching. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 38, n. 6, p. 983–996, 1998.

WRIGHT, G. D. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. **Nat. Prod. Rep.**, v. 34, n. 7, p. 694–701, 2017.

YANG, Y. S. et al. Discovery and modification of sulfur-containing heterocyclic pyrazoline derivatives as potential novel class of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 14, p. 4619–4624, 2012.

ZHANG, H. J. et al. Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase III (FabH) as novel antibacterial agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 15, p. 4513–4519, 2011.

ZHANG, Y.-M.; WHITE, S. W.; ROCK, C. O. Inhibiting bacterial fatty acid synthesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 26, p. 17541–17544, jun. 2006.

Anexo I - Descrição do Teste Biológico

Descrição do Teste Biológico I

A atividade antibacteriana dos compostos sintetizados foi testada contra *E. coli*, utilizando meio MH (meio Mueller-Hinton: hidrolisado de caseína 17,5 g, amido solúvel 1,5 g, extracto de carne 1000 mL). As CIM (concentrações inibitórias mínimas) dos compostos de teste foram determinadas por um método colorimétrico utilizando o tinte MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil trotrazolio). Foi preparada uma solução-mãe do composto sintetizado (100 µg / mL) em DMSO e as quantidades classificadas dos compostos de teste foi incorporada numa quantidade especificada de meio MH líquido esterilizado. Uma quantidade especificada do meio contendo o composto foi vertida em placas de microtitulação. A suspensão do microrganismo foi preparada para conter aproximadamente 10^5 ufc / mL e aplicada em placas de microtitulação com compostos diluídos em série em DMSO para ser testada e incubada a 37 ° C durante 24 h. Após a determinação visual das MICs em cada uma das placas de microtitulação, 50 µL de PBS (solução salina tamponada com fosfato 0,01 mol / L, pH 7,4: Na₂HPO₄·12H₂O 2,9 g, KH₂PO₄ 0,2 g, NaCl 8,0 g, KCl 0,2 g, água destilada 1000 mL) contendo 2 mg de MTT / mL a cada poço. A incubação foi continuada à temperatura ambiente durante 4-5 h. O conteúdo de cada poço foi removido e foram adicionados 100 µL de isopropanol contendo 5% 1 mol / L de HCl para extrair o corante. Após 12 h de incubação à temperatura ambiente, a densidade óptica (OD) foi medida com um leitor de microplacas a 550 nm

Anexo I - Descrição do Teste Biológico

Teste Biológico Tipo 2

A inibição de FabH purificado foi medida com um ensaio de proximidade de cintilação. As reações foram realizadas a temperatura ambiente em placas brancas de poliestireno com 384 poços em um tampão constituído por HEPES 60 mM (pH 7,0), ditioneitol 2,4 mM, 0,0024% de Brij-35, MgCl₂ a 6 mM e 24% (v / v) glicerol. Os compostos a serem testados foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO). Um conjunto de diluições em série, em duplicada, a uma concentração final de 50 vezes foi preparado em DMSO, e foram adicionados 0,6 µl de cada um aos poços. As reações de 30 µl continham 200 nM de proteína transportadora biotinilada de malonil-acil, 60 nM [³H] acetil-CoA (Moravek) com uma radioatividade específica de 37 Ci / mmol, 190 nM de acetil-CoA (Sigma) e enzima FabH não marcada. As concentrações de isoenzimas de FabH foram de 100 pM, para isoenzimas E. coli. Após 30 minutos, as reações foram interrompidas pela adição de 20 µl, por poço, de pérolas SPA de estreptavidina-poliviniltoluidina (Perkin-Elmer) e ácido cítrico (pH 2,0) até concentrações finais de 5 mg / ml e 0,3 M, respectivamente. Finalmente, adicionou-se 20 µl, por poço, de CsCl 7 M para fazer com que as esferas do SPA flutuasse. As placas foram seladas com película transparente e incubadas durante um mínimo de 3 horas. A radioatividade foi medida com um leitor de placas TopCount (Perkin-Elmer). A percentagem de inibição para a concentração de inibidor [I] foi calculada por referência a um sinal de não inibidor (MAX) (apenas DMSO) e a um sinal de inibição de 100% de ácido cítrico (pH 2,0) com a equação % de inibição = 100 * [1 - (sinal para [I] - MIN) / (MAX - MIN)]. A concentração de inibidor que deu 50% de inibição (IC₅₀) foi calculada por regressão de mínimos quadrados não lineares usando a equação % de inibição = 100 [I]ⁿ / (IC₅₀ + [I]ⁿ), onde n é o coeficiente de Hill.

Anexo II – Script Cálculo da similaridade de Tanimoto x Atividade Biológica

```
#!/bin/bash

rm RESULTADO_arestas.csv

echo "Source;Target;Type;tanimoto;AB_S;AB_T" > RESULTADO_arestas_maccs.csv

awk '{print $1}' $1 > MOLS

for i in `more MOLS`
do
for j in `more MOLS`
do
line1=`sed -n /${i}/= < $1`
line2=`sed -n /${j}/= < $1`
if [ "$line1" -lt "$line2" ]
then
echo "${i}_${j}" > compare

tani=$(babel ${i}.mol2 ${j}.mol2 -ofpt -xfMACCS | grep "Tanimoto from" | awk
'{print $7}')

ativ1=`sed -n "${line1}p" $1 | awk '{print $2}'`
ativ2=`sed -n "${line2}p" $1 | awk '{print $2}'`

echo "$line1;$line2;Undirected;$tani;$ativ1;$ativ2" >>
RESULTADO_arestas.csv

fi
done
done

perl -ni.bak -e "print unless /;;/" RESULTADO_arestas.csv

echo "#####"
```

```
echo "Compute SALI and SHoLI to complement your results"  
echo "#####"
```

Anexo III- Similaridade 3D *ShaEP*

```
#!/bin/bash

#
# Para rodar esse software vc vai precisar do SHAEP e do Pharmacophore
# http://www.tcd.uni-konstanz.de/research/pharmacophore.php
# http://users.abo.fi/mivainio/ShaEP/download.php
#

echo "Source;Target;Type;SIMI;AB_S;AB_T" > RESULTADO_edges_SHAEP.txt
awk '{print $1}' $1 > MOLS

for i in `more MOLS`
do
for j in `more MOLS`
do
#
# Pares
#
line1=`sed -n /${i}/= < $1`
line2=`sed -n /${j}/= < $1`
if [ "$line1" -lt "$line2" ]
then
echo "${i}_${j}" > compare
#
# FLEXIBLE ALIGN
#

rm -r DIR_TEMP
rm similarity.txt out.sdf similarity_hits.txt

printf 'score donor donor -6.00 0.25
score acceptor acceptor -6.00 0.25
score donacc donacc -6.00 0.25
score donacc acceptor -3.00 0.25
score donacc donor -3.00 0.25
score nonpolar_noring nonpolar_noring -3.25 0.25

ringscore -10.00 0.25

alignment_torsion_weight 2.0

aco_sigma 1.0
aco_ants 20
aco_evap 0.2

search_speed speed1
pher_smoothings 3
pher_pbest 0.5
pher_force_descent_update 5
simplex_tolerance 0.02
refine_simplex_tolerance 0.0001
```



```

ligand_file %s.mol2
ligand_file %s.mol2

output_dir DIR_TEMP' "$i" "$j" > align_flexible.conf

pharmACophore_64bit --mode align align_flexible.conf

mv DIR_TEMP/aligned_${i}_conf_01.mol2 .
mv DIR_TEMP/aligned_${j}_conf_01.mol2 .

ShaEP -q aligned_${i}_conf_01.mol2 aligned_${j}_conf_01.mol2 -s out.sdf
similarity.txt

similar=$(sed "1 d" similarity.txt | awk '{ print $2}')

rm aligned_${i}_conf_01.mol2 aligned_${j}_conf_01.mol2

#
# Delta activity
#
ativ1=`sed -n "${line1}p" $1 | awk '{print $2}'`
ativ2=`sed -n "${line2}p" $1 | awk '{print $2}'`

echo "$line1;$line2;Undirected;$similar;$ativ1;$ativ2" >>
RESULTADO_edges_SHAEP.txt

fi
done
done

perl -ni.bak -e "print unless /;;/" RESULTADO_edges_SHAEP.txt

echo "#####"
echo "Compute SALI and SHoLI to complement your results"
echo "#####"

```

Anexo IV – Script pareador com Pharmacophore.

```
#
# FLEXIBLE ALIGN : Flexalign molecule1.mol2 molecule2.mol2
#
## ./Flexalign em seguida o o primeiro ligante
i=$(echo $1 | cut -f 1 -d '.')
j=$(echo $2 | cut -f 1 -d '.')
printf 'score donor donor -6.00 0.25
score acceptor acceptor -6.00 0.25
score donacc donacc -6.00 0.25
score donacc acceptor -3.00 0.25
score donacc donor -3.00 0.25
score nonpolar_noring nonpolar_noring -3.25 0.25
ringscore -10.00 0.25
alignment_torsion_weight 2.0
aco_sigma 1.0
aco_ants 20
aco_evap 0.2
search_speed speed1
pher_smoothings 3
pher_pbest 0.5
pher_force_descent_update 5
simplex_tolerance 0.02
refine_simplex_tolerance 0.0001
ligand_file %s.mol2 fixed
```

```
ligand_file %s.mol2

output_dir DIR_TEMP "$i" "$j" > align_flexible.conf

pharmACOPhore_64bit --mode align align_flexible.conf

mv DIR_TEMP/aligned_${i}_conf_01.mol2 .

mv DIR_TEMP/aligned_${j}_conf_01.mol2 .

ShaEP -q aligned_${i}_conf_01.mol2 aligned_${j}_conf_01.mol2 -s out.sdf similarity.txt

similar=$(sed "1 d" similarity.txt | awk '{ print $2}')

echo similarity.txt

# rm aligned_${i}_conf_01.mol2 aligned_${j}_conf_01.mol2

# rm -r DIR_TEMP

# rm similarity.txt out.sdf similarity_hits.txt
```